

**Das Topoisomerase-II β -bindende Protein 1:
Untersuchungen zur Regulation des Genpromotors
und Funktion des Proteins**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologe Christian Ußkilat

geboren am 23. Juni 1976 in Itzehoe

Gutachter:

1. Prof. Hans-Peter Saluz
2. Prof. Frank Große
3. Prof. Johannes H. Hegemann
4. Prof. Martin Eilers

Tag des Rigorosums: 8. September 2006

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. November 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Topoisomerase II β -bindende Protein 1	3
1.2 RNA-Interferenz	6
1.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)	8
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Stämme	12
2.1.2 Zelllinien	12
2.1.3 Nukleinsäuren	12
2.1.3.1 Plasmide	12
2.1.3.2 Primer	13
2.1.4 Medien	14
2.1.4.1 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien	14
2.1.4.2 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Säugerzellen	15
2.1.5 Lösungen	15
2.1.6 Puffer	17
2.1.7 Chemikalien	18
2.1.8 Standards	19
2.1.9 Enzyme	19
2.1.10 Filme, Filter und Geräte	20
2.1.11 Antikörper	20
2.1.11.1 Primärantikörper	20
2.1.11.2 Sekundärantikörper	21
2.1.12 Kits	21
2.2 Methoden	22

2.2.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> nach Hanahan (1983)	22
2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	22
2.2.1.2 Transformation	22
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	22
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Midi- und Maxipräparation)	23
2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.2.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA	24
2.2.6 Bearbeitung von Plasmid-DNA	24
2.2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.7.2 zielgerichtete Mutagenese	24
2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen	25
2.2.9 Elektrophorese von RNA	25
2.2.10 Präparation von mRNA aus Total-RNA	26
2.2.11 Reverse Transkription	26
2.2.12 Zellkultur	26
2.2.12.1 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen durch Kalziumphosphat-Präzipitation	27
2.2.12.2 Transfektion mit RNAi-Fect	27
2.2.13.1 Indirekte Immunfluoreszenz	27
2.2.13.2 Test auf Mycoplasmen	28
2.2.14 Proteinbestimmung	28
2.2.14.1 TCA-Fällung	28
2.2.14.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.14.3 Western Blot (Towbin et al., 1979)	29
2.2.14.4 <i>Stripping</i> von Western-Blots	30
2.2.14.5 Messung der Luziferaseaktivitäten von Zellextrakten	30
2.2.15 Chromatin-Immunopräzipitation	30
2.2.16 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	31
2.2.16.1 Herstellen der 2D-Polyacrylamidgele	31
2.2.16.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	32
2.2.16.3 SDS-PAGE	33
2.2.16.4 Kolloidale Coomassie-blue Färbung	33
2.2.16.5 Silberfärbung	33

2.2.16.6 Auswertung der 2D-Gele	33
2.2.16.7 Stechen der Spots und Dot-Blot	34
2.2.17 EMSA	34
2.2.17.1 Herstellung der Zell-Lysate für den EMSA	35
2.2.17.2 Gelretardation	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Analyse des TopBP1 Promotors : Identifizierung von interagierenden Transkriptionsfaktoren	37
3.1.1 Suche nach Bindestellen von Transkriptionsfaktoren	37
3.1.2 Aktivitäten der Promotorregion	40
3.1.3 Beeinflussung des Promotors durch Transkriptionsfaktoren	41
3.1.4 Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor <i>in vitro</i>	42
3.1.5 Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor <i>in vivo</i>	46
3.1.6 Beeinflussung der Deletionsmutanten durch Egr-1	47
3.1.7 Mutagenese der Egr-1 Bindestellen im TopBP1 Promotor	49
3.1.8 Mutagenese der E2F Bindestellen im TopBP1 Promotor	51
3.1.9 Einfluss von UV-B Strahlung auf die Expression von Egr-1 in HeLa-Zellen	53
3.1.10 Beeinflussung des TopBP1 Promotors durch UV Strahlung	54
3.2 Untersuchung der Funktion von TopBP1 in der Zelle	55
3.2.1 Suppression von TopBP1 durch pSUPER	56
3.2.2 Suppression von TopBP1 durch siRNA	59
3.2.3 Einfluß des TopBP1-knock-downs auf das Wachstum von HeLa-Zellen	62
3.3 Etablierung der experimentellen Voraussetzung für eine Proteomanalyse von HeLa Zellen nach TopBP1 knock-down	64
3.3.1 Identifizierung von TopBP1 im HeLa-Proteom	64
3.3.2 Vergleichende Analyse nach TopBP1 knock-down im 2D-Gel	66
4. Diskussion	68
4.1 Identifizierung des Transkriptionsfaktors Egr-1 als Regulator des TopBP1-Gens	68

4.2 TopBP1 knock-down durch RNA-Interferenz	76
4.3 Differentielle Genexpression nach TopBP1 knock-down	79
4.4 Ausblick	81
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
ADP	-	Adenosindiphosphat
AIF	-	<i>apoptosis inducing factor</i>
AS	-	Aminosäure
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i> (kommerzielle Zell- und Gewebekbank)
ATM	-	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATR	-	<i>ATM related</i>
bp	-	Basenpaare
BRCA1	-	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCT	-	BRCA1 Carboxy-Terminus
BSA	-	Bovines Serumalbumin
Cdc	-	<i>cell division control</i>
Cdk	-	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	-	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CTP	-	Cytidintriphosphat
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DDK	-	<i>Dbf4-dependent kinases</i> (Dbf4-abhängige Kinasen)
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ds	-	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
dNDP	-	Desoxynukleosiddiphosphat
DTT	-	Dithiothreitol
ECL	-	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EGTA	-	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	-	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	-	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
GTP	-	Guanosintriphosphat
GST	-	Glutathion S-Transferase
HPV	-	Humane Papillomaviren
IC	-	Initiationskomplex
IF	-	Immunofluoreszenz
IP	-	Immunopräzipitation
IPTG	-	Isopropylthio- β -D-galactosid
IVT	-	<i>in vitro</i> Translation/Translatat
kDa	-	Kilodalton
MCM	-	<i>minichromosome maintenance</i>
MOPS	-	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	-	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NAD	-	Nicotinamid-adenin-dinukleotid

NBS	-	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
nt	-	Nukleotide
OD	-	optische Dichte
ORC	-	<i>origin recognition complex</i>
PAGE	-	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	-	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	-	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	-	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI3-Kinase	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLM	-	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol ϵ	-	DNA-Polymerase ϵ
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid
Rb	-	Retinoblastoma
RISC	-	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	-	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	-	RNA Interferenz
RPA	-	<i>replication protein 1</i>
rpm	-	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	-	Raumtemperatur
RT-PCR	-	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	-	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	-	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	-	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
Tab.	-	Tabelle
TBS	-	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCF-4	-	<i>T-cell factor</i>
TdR	-	Thymin
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	-	<i>tumor growth factor-β</i>
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	-	Thymintriphosphat
U	-	<i>unit</i> (Einheit)
UV	-	ultraviolett
WB	-	Western Blot
XRCC1	-	<i>X-ray repair cross-complementing 1</i>

1. Einleitung

Das charakteristischste Merkmal eines Lebewesens ist die Fähigkeit zur Selbstreproduktion. Hierbei wird der gesamte Informationsgehalt von der Mutter- auf die Tochterzelle übertragen. Neben Wachstum und Differenzierung stellt auch der Tod von Zellen in unserem Organismus einen essentiellen Faktor zum Überleben dar. Der physiologische oder programmierte Zelltod stellt im Körper das Gleichgewicht zu den ständig neu gebildeten Zellen her. Der Begriff Apoptosis setzt sich aus den griechischen Wörtern apo – weg und ptosis – Senkung zusammen und wurde von seinem Entdecker John F.R. Kerr geprägt. Der Stellenwert dieses Vorgangs lässt sich daran ermessen, dass er im menschlichen Körper täglich 10 Milliarden Zellen betrifft. Die Apoptose verläuft nach einem genetisch fixierten Schema, dass sowohl durch endogene, als auch exogene Faktoren ausgelöst werden kann. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts hin zu verstärktem Zellwachstum ist ein fundamentaler Schritt der Tumorgenese.

Eine Ursache hierfür ist häufig die fehlerhafte Weitergabe der genetischen Information in der Zellteilung. Um dem vorzubeugen, haben alle Lebewesen umfangreiche Kontrollmechanismen im Rahmen des Zellzyklus entwickelt. Der Zellzyklus in Säugerzellen ist in vier Phasen unterteilt. Die DNA-Replikation findet in der Synthese-Phase, oder S-Phase statt; die eigentliche Zellteilung in der Mitose, oder M-Phase. Getrennt werden diese Stadien im Zellzyklus durch zwei weitere Wachstumsphasen, G1 und G2. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen unterliegen strikten Kontrollmechanismen, die die Abfolge der einzelnen Schritte absichern.

Beim Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste, muss die Zelle entscheidende Kontrollpunkte passieren. Die Regulation dieses Prozesses wird durch Cyclin abhängige Kinasen (CDK) realisiert. Diese Kinasen bilden Komplexe mit ihren Co-Faktoren, den Cyclinen. Durch diese Komplexbildung werden die Kinasen aktiviert und phosphorylieren ihre Substratproteine wie etwa die Pocketproteine der Retinoblastom-Familie (Rb). Die Entscheidenden Kontrollpunkte im Zellzyklus werden durch diese Cyclin/CDK-Komplexe reguliert.

Die charakteristische Bindungstasche der Proteine der Rb-Familie (Pocket-Domäne) prägte den Begriff „Pocketproteine“. Die Proteine der Rb-Familie besitzen die Fähigkeit, reversibel an Transkriptionsfaktoren zu binden, wie z.B. E2F. Die wachstumskontrollierende Funktion von pRb beruht auf der durch die Interaktion mit den Transkriptionfaktoren hervorgerufene Repression ihrer Targetgene. pRb hemmt somit spezifisch die Promotoraktivierung Zellzyklus regulierender Gene. Durch diese Hemmung von Zellzyklus relevanten Genen und deren Genprodukten wird die Zelle im Zellzyklus (in diesem Fall in der G1-Phase) arretiert. Für die Progression des Zellzyklus ist es also erforderlich, dass pRb durch die CDKs phosphoryliert und somit inaktiviert wird.

Die Aktivität der CDK wird durch spezifische Inhibitoren negativ reguliert. Es konnte bisher 2 Subfamilien dieser Cyclin abhängigen Kinase Inhibitoren (CDKI) identifiziert werden, die in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus regulierend eingreifen können. Die CIP/KIP Familie (CDK inhibiting protein/kinase inhibiting protein) hemmt bevorzugt CDK2 und CDK4, wohingegen die Inhibitoren der INK4-Familie (**In**hibitor CDK**4**) spezifisch CDK4 und CDK6 hemmen. Der durch diese Inhibitoren hervorgerufene Zellzyklusarrest ist für die Kontrollpunkte im Zellzyklus von großer Bedeutung.

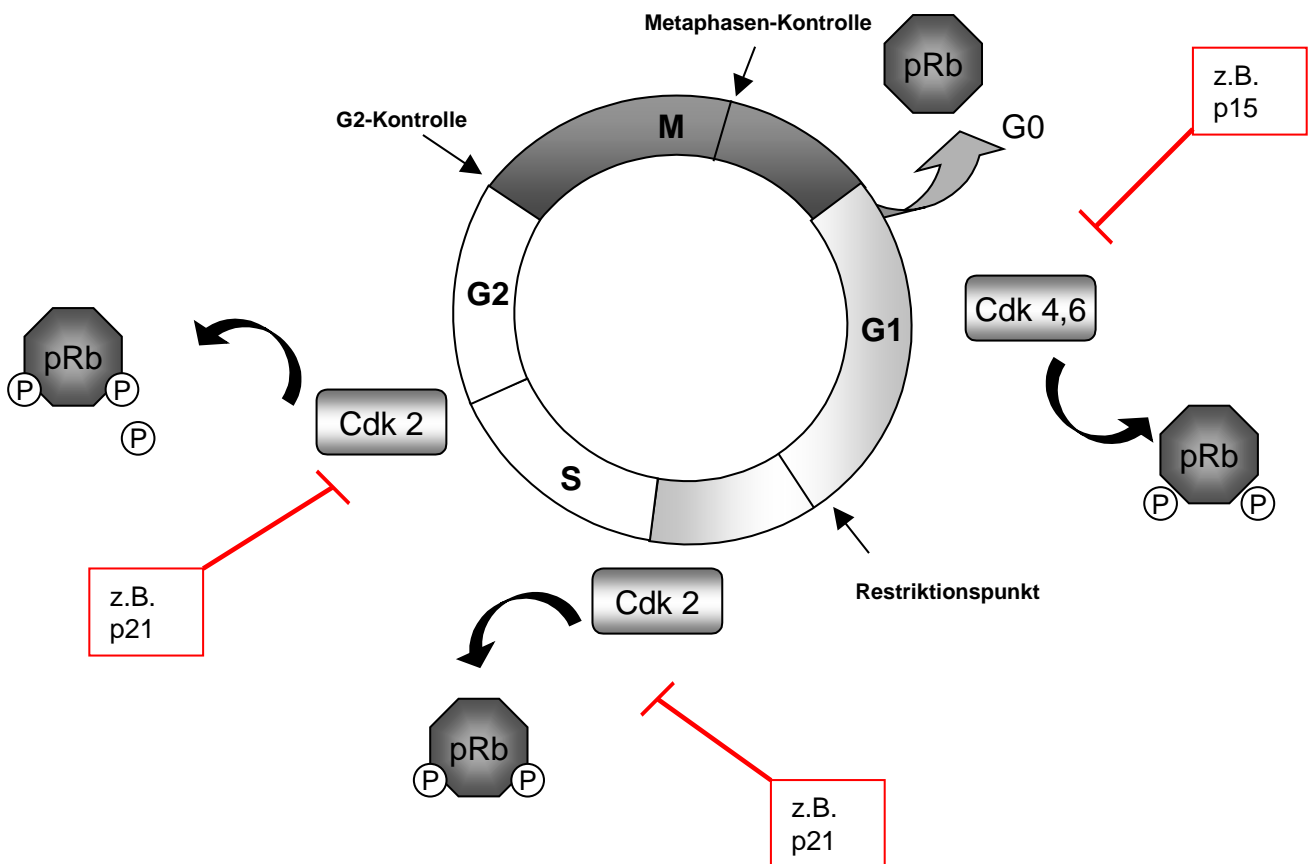


Abb. 1: Kontrollpunkte des Zellzyklus

In jeder der Zellzyklusphasen werden spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDK (Cyclin Dependent Kinases) interagieren und sie hierdurch aktivieren. Diese CDK phosphorylieren Rb und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus bis Rb gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M-Phase erneut in die G1-Phase eintreten.

Bevor Zellen in die S-Phase eintreten können, müssen sie in der späten G1-Phase den sogenannten Restriktionspunkt passieren. Weitere Kontrollpunkte befinden sich in der Mitose (Metaphase/Anaphase-Übergang) und am Ende der G2-Phase (G2/M-Übergang). An diesen Übergängen wird die Integrität der DNA durch ein System von Sensoren überprüft, die in sogenannten DNA-checkpoints organisiert sind. Werden Schäden registriert, leiten Signalproteine in diesen „checkpoints“ die Information über konservierte Kaskaden weiter und lösen einen zeitweiligen Stopp im Zellzyklus aus. Als Folge werden Reparaturmechanismen eingeleitet oder im Falle irreparabler Schäden der programmierte Zelltod eingeleitet.

Die Kontrollpunkte verhindern, dass sich Fehler in der Replikation des genetischen Codes als Mutation in der folgenden Zellgeneration manifestieren. Bei einem Versagen dieser Mechanismen kommt es zu einer Anhäufung von genetischen Veränderungen, die das empfindliche Gefüge zwischen Proliferation und Zelltod stören und zur Tumorbildung führen. Die Identifizierung der in diesen Netzwerken organisierten Proteine und die Aufklärung ihrer Funktion ist essentiell für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Cancerogenese und der Entwicklung von therapeutischen Strategien.

1.1. Das Topoisomerase II β -bindende Protein 1

Das Topoisomerase-II β -Binding Protein 1 (TopBP1) wurde in einem Zwei-Hybridscreen als Interaktionspartner von Miz-1 identifiziert (Herold et al., 2002). Yamane et al. (1997) beschrieben es zuvor über seine Assoziation mit der Topoisomerase II β . Die Struktur von TopBP1 wird durch 8 BRCT-Domänen (BRCA1-carboxy terminus) dominiert. Diese Proteinmotive wurden ursprünglich im Genprodukt des Brustkrebsgens *Breast cancer susceptibility gene 1* gefunden (Koonin et al., 1996). Durch diese Proteinmotive werden Interaktionen zwischen Proteinen untereinander oder mit der DNA vermittelt. Dieses Proteinmotiv wird durch ein Cluster von hydrophoben Aminosäuren definiert, dessen Kristallstruktur durch vier parallele β -Faltblattstrukturen charakterisiert wird, die den Kern bilden. Drei weitere α -Helices umgeben diesen (Zhang et al., 1998). BRCT-Domänen sind weit verbreitet und wurden mittlerweile in 40 weiteren Proteinen gefunden (Bork et al., 1997, Callebaut & Mornon, 1997).

Ein Beispiel hierfür ist das Protein Mus 101 aus *Drosophila melanogaster* zu nennen, welches gleich 7 BRCT Domänen beinhaltet. Mutationen in dem Drosophila mus-101 Gen führen zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Organismen gegenüber ionisierender Strahlung.. In *Saccharomyces cerevisiae* existiert ein Homolog zum Rad4/Cut5 Protein. Es ist für den S-Phase checkpoint und die Aktivierung der checkpoint-Kinase Rad53 von Bedeutung (Wang & Elledge, 1999). Das

Hefefusionsprotein spielt eine Rolle bei der Überprüfung der Integrität der DNA nach der Replikation und bei DNA-Schäden. TopBP1 wird zunehmend als menschliches Homolog dieser Proteine betrachtet (Yamane *et al.*, 2002) und besitzt wahrscheinlich ähnliche Aufgaben. Das als Dpb 11 bezeichneten Proteine besitzt wie Rad4/Cut5 4 BRCT Domänen und interagiert mit den *checkpoint*-Proteinen Ddc1 und Drc1. Des Weiteren sind Interaktionen mit der DNA-Polymerase ϵ und Cdc45 gefunden worden (Araki *et al.*, 1995, Kamimura *et al.*, 1998, Masumoto *et al.*, 2000, Wang & Elledge, 2002). Im Allgemeinen übernehmen Proteine mit BRCT-Motiven häufig Funktionen im Rahmen der DNA-Reparatur (z.B. XRCC1, DNA Ligase III und IV, PARP-1) und der Zellzykluskontrolle (z.B. p53BP, Rad9).

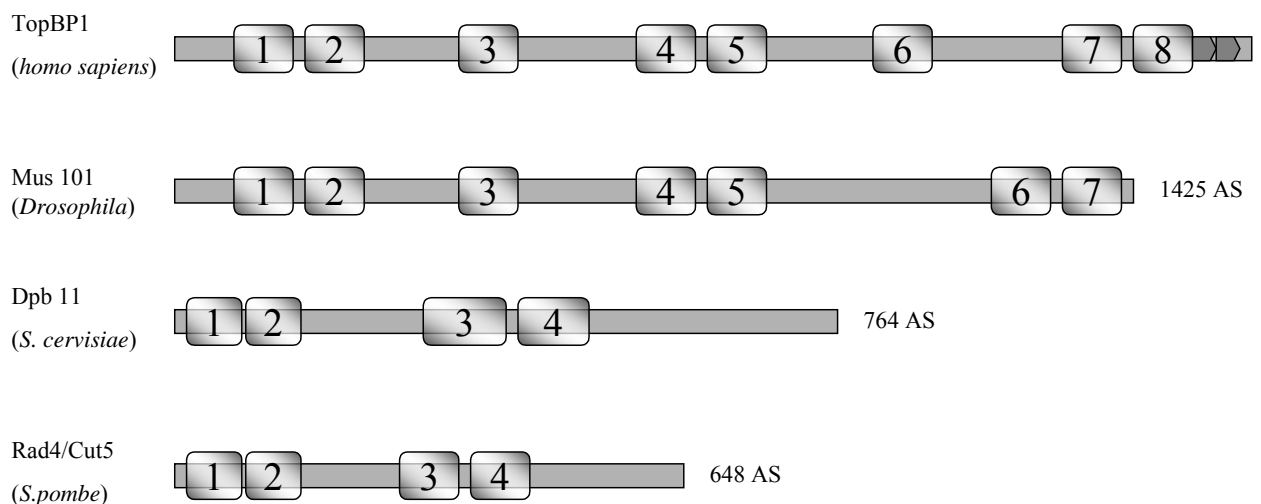


Abb.2: Schematische Darstellung von TopBP1, Mus101, Dpb11 und Cut5/Rad4.

Nach neuen Erkenntnissen sind die BRCT Domänen in der Lage, den Phosphorylierungszustand des Interaktionspartners zu erkennen (Yu *et al.*, 2003, Manke *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003), wobei die phosphorylierte Form präferentiell gebunden wird. Ein Interaktionspartner von TopBP1, bei dem dies von Bedeutung ist, ist der Transkriptionsfaktor E2F1. Die Interaktion wird über die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 ausgebildet (Yu *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003), welche das unphosphorylierte E2F1 von dieser Bindung diskriminiert. TopBP1 ist in der Lage, durch die Bindung die E2F1 vermittelte Apoptose zu inhibieren. Einhergehend mit der Bindung an E2F1 rekrutiert TopBP1 den Proteinkomplex Brg1/Brm und ermöglicht so dessen Interaktion mit E2F1 (Liu *et al.*, 2004). Hierdurch werden die Funktionen von E2F1 unterdrückt.

TopBP1 kann selbst Ziel einer Phosphorylierung werden. Als Folge einer γ -Bestrahlung oder durch Replikationsstress fungiert TopBP1 als Substrat für die ATM-Kinase (Yamane *et al.*, 2002). Selbst besitzt TopBP1 keinerlei Enzymaktivität. Durch seine BRCT-Domänen 1-2 und 6-8 ist TopBP1 in der Lage, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Einzelstrangbrüche in zirkulärer DNA zu binden (Yamane & Tsuruo, 1999). Nach einer derartigen DNA-Schädigung formt TopBP1 zusammen mit weiteren Proteinen, die an der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche beteiligt sind, sogenannte Foci. An diesen blockierten Replikationsgabeln sind z.B. PML, ATM, BRCA1, MBS, 53BP1 und PCNA in diesen Foci organisiert (Mäkinen *et al.*, 2001, Yamane *et al.*, 2002, Honda *et al.*, 2002, Juvansuu *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2003, Greer *et al.*, 2003, Perera *et al.*, 2004). Zusätzlich dazu wurde TopBP1 während der Mitose zusammen mit BRCA1 in den Centrosomen gefunden (Reini *et al.*, 2004).

TopBP1 Domänen	Interaktionspartner	Nachweis	Referenz
BRCT 4-5	hRAD	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Mäkinen <i>et al.</i> , 2001 Greer <i>et al.</i> , 2003
BRCT5-6	hHYD	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Honda <i>et al.</i> , 2002
BRCT6	E2F1	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Liu <i>et al.</i> , 2003
BRCT6-8	HPV 16 E2 Topo II β	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	Boner <i>et al.</i> , 2002 Yamane <i>et al.</i> , 1997
BRCT7-8	Miz1	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Herold <i>et al.</i> , 2002
unbekannt	PML	<i>in vivo</i>	Xu <i>et al.</i> , 2003
unbekannt	Brg1/Brm	<i>in vivo</i>	Liu <i>et al.</i> , 2004

Tab. 1 bekannte Protein-Protein-Interaktionen von humanem TopBP1

Über die 5-6 BRCT-Domäne bildet TopBP1 eine Bindung mit hHYD (*hyperplastic disc*) aus (Honda *et al.*, 2002). hHYD gehört zur Gruppe der Ubiquitin-Ligasen, auf welche durch spezifische E2-Enzyme Ubiquitinmoleküle übertragen werden. Durch diese Ubiquitinilierung werden Proteine für den Abbau durch das Proteasom „markiert“. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung nach einer γ -Bestrahlung von Zellen einen stabilisierenden Einfluss auf TopBP1 hat. Auch die Assoziation mit PML (*promyelocytic leukemia protein*) kann die Ubiquitinilierung von TopBP1 reduzieren (Honda *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2003). PML spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der *PML nuclear bodies* und übernimmt Funktionen in der Apoptoseregulation und der Transkription.

1.2. RNA-Interferenz

In der Grundlagenforschung ist das gezielte Abschalten für die Charakterisierung eines Gens durch molekulargenetische Methoden von großer Bedeutung. Eine hierfür verwendete Methode ist die sogenannte RNA-Interferenz.

Anfang der 1980er Jahre wurde beobachtet, dass mRNA durch eine komplementäre (antisense) RNA ausgelöscht werden kann. Dieser Abbauvorgang erfolgte nach der Transkription der mRNA und wurde dementsprechend als PTGS (**posttranscriptional gene silencing**) bezeichnet. Der Mechanismus der RNA-Interferenz ist evolutionär in Eukaryoten konserviert. Es konnte in vielen Modellorganismen gezeigt werden, dass durch Einbringen einer komplementären Kopie des Zielgens in eine Zelle, dieses Gen posttranskriptionell stillgelegt werden kann. In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde durch Injektion einer dsDNA 1995 erstmals ein Gen gezielt durch diese Methode ausgeschaltet (Guo & Kempheus, 1995, Fire *et al.*, 1998). Vergleichbare Beobachtungen wurden später auch in Pflanzen und *Drosophila* gefunden (Vance & Vaucheret, 2001, Kenderell & Carthew, 2000). Der zugrundeliegende Mechanismus konnte erst später aufgeklärt werden.

Nach dem Einbringen der doppelsträngigen RNA wird diese von dem Enzym DICER in 21bp lange Fragmente „zerhackt“. Bei dem Enzym handelt es sich um eine RNase mit Homologien zur bakteriellen RNase III. Die 21bp langen Produkte wurden als siRNAs (small interfering RNAs) bezeichnet. Die doppelsträngigen siRNAs werden unter ATP-Verbrauch zu Einzelsträngen entwunden und an einen als RISC (RNA-induced silencing complex) bezeichneten Proteinkomplex rekrutiert. Der Ribonukleoproteinkomplex erlangt seine Spezifität durch die Bindung der siRNA, die komplementär zu der gebundenen 21bp langen RNA ist. Die Zielsequenz (mRNA) wird unter ATP-Verbrauch gebunden und spezifisch durch enzymatische Hydrolyse zerschnitten (Zamore *et al.*, 2000, Hammond *et al.*, 2000, Bernstein *et al.*, 2001).

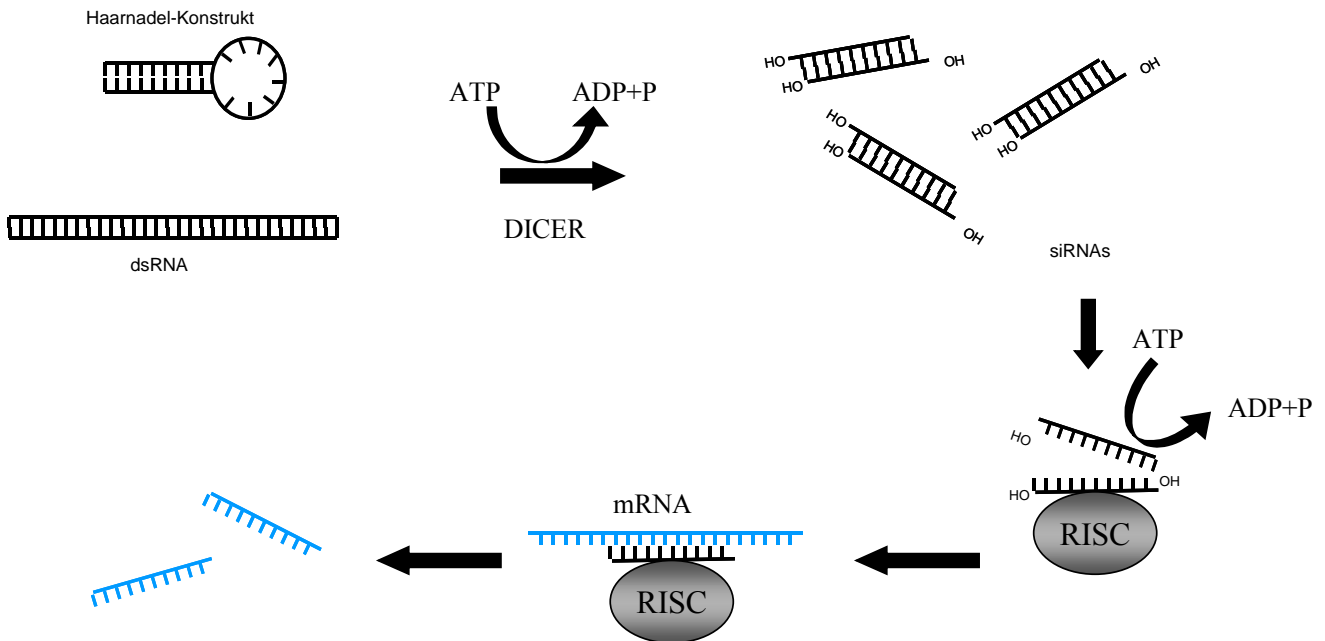


Abb. 3 Mechanismus der RNA-Interferenz

Doppelsträngige RNA wird dem Enzym DICER in doppelsträngige siRNAs mit einer Länge von 21bp zerlegt. Diese siRNAs werden an den RISC-Komplex rekrutiert und unter ATP Verbrauch entwunden. Der gebundene Antisense-RNA-Strang verleiht dem Komplex seine Spezifität. Nach der Bindung an die komplementäre mRNA erfolgt deren Degradation.

Welche Aufgaben der Mechanismus der RNAi in der Zelle übernimmt ist noch nicht endgültig geklärt. Eine Erklärung ist die Möglichkeit durch RNAi die Ausbreitung von Retroviren in einem Organismus zu bremsen. Retroviren tragen ein RNA-Genom in sich, dass nach dem Eindringen in eine Zelle in DNA umgeschrieben wird. Durch den Einbau in das Genom können solche Viren eine längere Latenzzeit verweilen, bis die Viren-DNA in mRNA transkribiert und zum Aufbau weiterer Viren verwendet wird. Es konnte gezeigt werden, dass das Eindringen von Viren in die Zelle nach dem Freisetzen der RNA den Mechanismus der RNA-Interferenz anschaltet. In diesem Fall werden Fragmente des Viren-RNA-Genoms an den RISC-Komplex rekrutiert und dazu verwendet, die später produzierte virale mRNA gezielt zu zerstören.

Durch die Möglichkeit, in einer Zelle gezielt bestimmte Gene auszuschalten, ist diese Methode für die Charakterisierung eines Gens von großer Bedeutung. Neben der phänotypischen Veränderung

einer Zelle lassen sich durch geeignete Methoden auch Einflüsse auf andere Gene oder Genprodukte erkennen.

1.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms ist bekannt, dass sich in den codierenden Bereichen nur ca. 30.000 Gene befinden. Die funktionelle Zuordnung dieser Gene ist von großem Interesse für das weitere Verständnis der Abläufe im Organismus.

Die Trennmethode, die derzeit für eine Proteomstudie die Anforderungen am besten erfüllt, ist die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE). Entwickelt wurde diese Methode von Klose und O'Farrell (1975). Durch das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode ist es möglich, ca. 10.000 Proteine darzustellen und so eine Proteom-Charakterisierung durchzuführen.

In der 2D-PAGE werden zwei unabhängige Trennschritte miteinander kombiniert. In der isoelektrischen Fokussierung, dem ersten Trennschritt, wird sich die Eigenladung der Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung genutzt. Die Proteine wandern durch ein elektrisches Feld entlang eines pH-Gradienten bis zu dem Punkt, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. An diesem isoelektrischen Punkt (IEP-pI) wandern die Proteine nicht weiter im elektrischen Feld und werden dort fokussiert. Proteine mit einer positiven Ladung wandern im elektrischen Feld zur Kathode (basischer pI), wohingegen eine negative Ladung die Proteine zur Anode (saurer Bereich) wandern lässt. Für die 2D-PAGE werden heute immobilisierte pH-Gradienten (IPG) in einer Polyacrylamid-Matrix eingesetzt. Hierbei werden schwache Säuren und Basen mit den Acrylamidmonomeren kopolymerisiert, wobei das Mischungsverhältnis den pH-Gradienten bestimmt. Durch die direkte Bindung an die Trägermatrix ist der pH-Gradient relativ Zeitstabil und hohen Proteinkonzentration gegenüber toleranter.

Im zweiten Trennschritt, der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis), werden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend getrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Es entstehen Micellen, die eine konstante negative Ladung pro Masseinheit besitzen. Die Laufeigenschaften der Proteine im elektrischen Feld werden somit nicht mehr von ihrer Eigenladung beeinflusst. Durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen durch das SDS wird auch die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Durch Zusatz von reduzierenden Thiolverbindungen (z.B. DTT) werden auch die Disulfidbrücken aufgebrochen. Der normale Trennbereich eines 2D-Gels umfasst einen pH-Bereich von 3-10 und einen Molekulargewichtsbereich von 5-200 kDa.

Nach der Auftrennung eines Proteoms müssen die Proteine für die folgende Bildbearbeitung detektiert werden. Es existieren verschiedene Detektionsmethoden für die Visualisierung der Proteine nach einer 2D-PAGE. Die Wahl einer geeigneten Färbemethode hängt von der Fragestellung und eventuellen nachfolgenden Analysemethoden ab (Tab. 2).

Färbemethode	Nachweisgrenze	MS-Kompatibel	Referenz
Silber	1 ng	nein	Heukeshoven et al., 1988
Silber	2-5 ng	ja	Nesterenko et al., 1994
Sypro Ruby	1 ng	ja	Yan et al., 2000
Zink Imidazol	10 ng	ja	Fernandez-Patro et al., 1998
Kolloidal Coomassie	8-10 ng	ja	Neuhoff, 1990
DIGE (Cy2, Cy3, Cy5)	100-200 pg	ja	Tonge et al., 2001
Phosphor Imaging ^{32}P	<1 ng	ja	Johnston et al., 1990

Tab. 2 Übersicht für in der Proteomanalyse verwendeten Detektionsmethoden nach einer 2D-PAGE

Bei einem direkten Proteom-Vergleich zur Charakterisierung von Expressionsunterschieden zweier Gele treten häufig Probleme in der Vergleichbarkeit auf. Die Varianzen zwischen den Gelen führen häufig zu Fehlinterpretationen. Zu diesem Zweck wurde die Methode der „Difference in Gel Elektrophoresis“ (DIGE) entwickelt. Durch diese Technik ist man heute in der Lage, 2 Proteome in einem Gel parallel aufzutrennen. Die zu vergleichenden Proben werden hierzu mit bis zu 3 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Über eine Esterverbindung werden die Fluorochrome an die Lysinreste in den Proteinen gebunden (Abb.4).

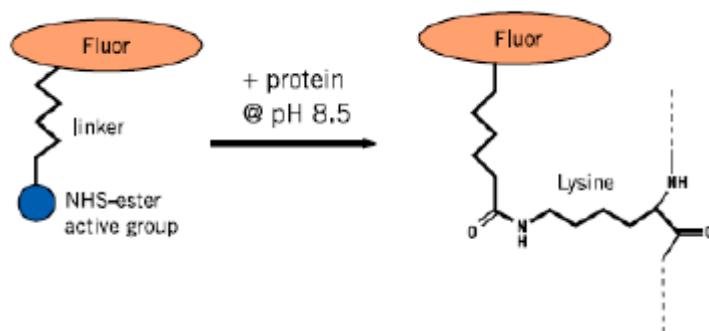


Abb. 4 Bindung des Fluorochroms an die Proteine

(Amersham Bioscience)

Die Fluorochrome werden bei der Detektion in einem Laserscanner bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und somit die Proben nach der Auftrennung in einem Gel separat detektiert. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, differentiell exprimierte Proteine nach der Elektrophorese aus dem Gel zu eluieren und durch weitere Methoden wie z.B. Matrix Assisted LASER Desorption/Ionisation Mass Spectrometry (MALDI- MS) zu analysieren

Durch die rasante Entwicklung der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese in den letzten Jahren, wurden große Proteindatenbanken angelegt, die nach erfolgter Analyse der Gele eine große Menge an Information bereitstellen.

1.4.Zielsetzung der Arbeit

TopBP1 ist an verschiedenen Prozessen, wie der DNA-Schadensantwort oder der DNA-Replikation beteiligt und übernimmt hier regulatorische Funktionen. Über die Regulation der Expression von TopBP1 selber ist nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, regulatorische Elemente im TopBP1 Promotor zu identifizieren und eine mögliche Beeinflussung der Expression durch Transkriptionsfaktoren nachzuweisen. Mit diesen Untersuchungen sollten neue Hinweise auf die Funktion von TopBP1 bei der Regulation des Zellzyklus gewonnen werden.

Durch die Technologie der RNA-Interferenz sollte die TopBP1-Expression in humanen Zellen gezielt herunterreguliert werden. Die Einflüsse des knock-down auf unbehandelte Zellen und auf Zellen, bei denen exogen DNA-Schäden induziert wurden, sollten analysiert werden.

Für die weiterführenden Untersuchungen des Einflusses von TopBP1 auf die Expression von anderen Proteinen sollte eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, den Effekt eines TopBP1 knock-downs auf das Proteom einer Zelle zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme

DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, end A1, gyr A96, thi-1, R17 (r _k ⁻ , m _k ⁻), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169
BL21-Codon plus TM -RIL	F ⁻ , ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^r , gal, endA, Hte[argU, ileY, leuW, Cam ^r] (STRATAGENE)
Xl-1	Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, (Tet ^r) (STRATAGENE)

2.1.2. Zelllinien

HeLa	Humane Cervix-Karzinom-Zelllinie mit amplifiziertem <i>c-myc</i> Gen (ATCC:CC12)
HeLa S3	Derivat der humanen HeLa Cervix-Karzinom-Zelllinie. Kann als Suspensionskultur gezogen werden (ATCC:CC1-22)
Ls174T	Humane kolonrektale Karzinomzelllinie, Derivat der Ls180 Karzinomzelllinie (ATCC:CL-188)

2.1.3. Nukleinsäuren

2.1.3.1. Plasmide

pBluescript KS ⁺	Klonierungs- und Sequenzierungsvektor, T ₃ - und T ₇ - Promotor (STRATAGENE)
pcDNA3	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen, viraler CMV-Promotor (INVITROGENE)

pGEX4T-3	Expressionsvektor für Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine (PHARMACIA)
pRL-SV40	Expressionsvektor für <i>Renilla</i> -Luziferase mit starkem, konstitutiven Promotor (PROMEGA)
pGL-3 basic	Expressionsvektor mit Luziferasegen für Promotorfragment (PROMEGA)
CMV- <i>lacZ</i>	Expressionsvektor für β -Galactosidase, <i>lacZ</i> -cDNA in pcDNA1 (INVITROGENE)
pSUPER	Expressionsvektor für siRNA in Säugerzellen, Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002
pASI	Expressions- und Klonierungsvektor

Tab. 3: Wichtige, während der Arbeit konstruierte Plasmide:

Plasmid	Ausgangsplasmid	Beschreibung
D1	pGL-3-basic	982 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopIntr.2, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D2	pGL-3-basic	393 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel6, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D3	pGL-3-basic	362 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel7, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D4	pGL-3-basic	309 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel1, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D5	pGL-3-basic	251 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel 2, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D6	pGL-3-basic	172251 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel 2, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel 3, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I
D4 E2F1 Mut	pGL-3-basic	309 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel1, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I, Mutationsprimer der E2F-Bindestelle E2Fmut-B/C 1/2
D4-Egr-1 Mut	pGL-3-basic	309 bp Promotor-PCR-Fragment, Primer Top-intr.4/TopDel 1, <i>Xho</i> I/ <i>Sst</i> I, Mutationsprimer der Egr-1-Bindestelle Egr1mut-1 for/rev

2.1.3.2. Primer

Tab. 4

Name	Sequenz	Enzym
TopBP intr.1	5'-GCC CTC GAG GCC TCA CTT ACC TCG TTG GAG CCT C-3'	<i>XhoI</i>
TopBP intr.2	5'-GCC GAG CTC TTA TCC CCT CTC CCT TTG CTCTCT G-3'	<i>Sst I</i>
TopBP intr.4	5'-GCC CTC GAG AGG GTC CTG AAG GCC ACA GAA GCC ATC G-3'	<i>Sst I</i>
TopDel1	5'-GCC GAG CTC GAT GGC GTC ACT TCC ACC GGA-3'	-
TopDel2	5'-GCC GAG CTC GTT CCC GTT CTG GGC AAT TTC-3'	-
E2F-Mut B/C1	5'-ACG GGA ACC GAC TTT CCT ACC AAC CGC GCG GCC GC-3'	-
E2F-Mut B/C2	5'-GCG GCC GCG CGG TTG GTA GGA AAG TCG GTT CCC GT-3'	-
Egr1-Mut1 for	5'-CCC CGA CTC GGC GCC GCA ACT ACC CCA AAG CAA A-3'	-
Egr1-Mut1 rev	5'-TTT GCT TTG GGG TAG TTG CGG CGC CGA GTC GGG G-3'	-
Egr1-Mut2 for	5'-CCA GCC CGG CGC ACA GCA ACC TCC CCC GAC TCG G-3'	-
Egr1-Mut2 rev	5'-CCG AGT CGG GGG AGG TTG CTG TGC GCC GGG CTG G-3'	-
RNA 2	5'-GAC AAC GCC ACT AAA AGG GTC ACA GA-3'	-

2.1.4. Medien

2.1.4.1 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl

LB_{Amp}-Medium LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin

LB_{Kan}-Medium LB-Medium; 10 µg/ml Kanamycin

LB-Agarplatten:	1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB; pH 7,5
SOC-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM Glucose
NZY ⁺ -Medium	10g/l NZ-Amin; 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 12,5mM MgSO ₄ ; 12,5mM MgCl ₂ ; 0,4% Glukose; pH 7,5

2.1.4.2 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Säugerzellen

Dulbecco's Medium W/O Phenol Red

- Kulturmedium:

Zusätze:	Fötales Kälberserum	10%
	L-Glutamin (200mM)	1%
	Penicillin/Streptomycin (1000U Penicillin, 10mg Streptomycin/ml)	1%

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glucose, Pyruvat, Glutamax™ I

- Kulturmedium

Zusätze:	Fötales Kälberserum	10%
	Penicillin/Streptomycin (1000U Penicillin, 10mg Streptomycin/ml)	1%

RPMI 1640 mit Glutamax™ I

- Kulturmedium:

Zusätze:	Fötales Kälberserum	10%
	Penicillin/Streptomycin (1000U Penicillin, 10mg Streptomycin/ml)	1%

- Einfriermedium (RPMI bzw. DMEM):

Zusätze:	Fötales Kälberserum	15%
	L-Glutamin (200mM)	1%
	Penicillin/Streptomycin (1000U Penicillin, 10mg Streptomycin/ml)	1%
	DMSO	10%

2.1.5. Lösungen

Ammoniumpersulfat (APS) 10% (w/v) in A.bidest.

30% Acrylamid 290 g/l Acrylamid, 10 g/l N.N'-Methylenbisacrylamid in 1l A. dest.

Aproteine	1 mg/l Aproteine in A. dest.
Bradfordlösung	100 mg/l Coomassie blue G-250, 47.5 ml/l Ethanol, 100 ml/l 50% H ₃ PO ₄ in A. dest.
DAPI	0,1 mg/ml in A.bidest.
10 mM dNTP-Mix	je 20 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP (100 mM Stammlösung) auf 920µl A.bidest.
Coomassiefärbelösung	40% Methanol, 10% Essigsäure, 0.2% Coomassie blue R 250
Coomassieentfärbelösung	40% Methanol, 10% Essigsäure
Desoxynukleosidtriphosphat	20 µl jedes dNTP's (100mM Stammlösung) auf 920 µl A. dest.
DEPC-Wasser	1:1000 DEPC in A. dest.
1,4-Dithiothreitol (DTT)	1.5 g DTT in 10 ml A. dest.
Ethidiumbromid	10 g/l Ethidiumbromid in A. dest.
Fixierlösung (DAPI)	1 Volumen Essigsäure, 3 Volumen Methanol
Glutathionelutionspuffer	10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 in A. dest.
Isopropylthio-β-D-galactosid (IPTG)	25 g/l IPTG in A. dest
Leupeptin	1 mg/ml Leupeptin in A. dest.
Lösung I	10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH8.0, 100 µg/ml RNase
Lösung II	200 mM NaOH, 1% SDS
Lösung III	2.8 M KOAc, pH 5.1
3-(N-Morpholino)propane-sulfonic acid (MOPS)	20.9 g MOPS in 100 ml A. dest.
Mounting Medium	70% Glycerin, 0.1% Na-Azid in PBS-Puffer
Paraformaldehydlösung (PFA)	3.7% PFA in PBS-Puffer
Perfect-Block	30% (w/v) in A.bidest.
Pepstatin	1 mg/ml Pepstatin in Methanol
Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF)	1.74 mg/ml PMSF in Isopropanol
Proteingelfärbelösung	40% Methanol, 10% Essigsäure, 0.2% Coomassie blue R 250
Proteingelentfärbelösung	40% Methanol, 10% Essigsäure (A. dest.)
RNase A-Lösung	100 mg/ml in A.bidest.
Strip-Lösung	62,5 mM Tris; 2% (w/v) SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol; pH 6,8
100% (w/v) TCA	500 g TCA auf 227 ml A.bidest.

TFB I	30 mM K-Acetat pH 6.0, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 10mM CaCl ₂ , 15% Glyzerin
TFB II	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15% Glyzerin
1M Tris	121.1 g/l Tris in A. dest. (verschiedene pH-Werte mittels HCl einstellen)
Stacking Acrylamid	48% Acrylamid, 1.5% Bis-Acrylamid
Separating Acrylamid	46.5% Acrylamid, 1.5% Bis-Acrylamid
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactosid, 20 mg/ml in Dimethylformamid

2.1.6. Puffer

DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC auf 1 l A.bidest.
HBS-Puffer	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.05
Kpi-Puffer	0.5 M K ₂ HPO ₄ , 0.5% M KH ₂ PO ₄
Binde-Puffer (EMSA)	20% Glycerol, 5mM MgCl ₂ , 2.5mM EDTA, 2.5mM DTT, 250mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5
Lysispuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄
PBS-Puffer-NP 40	PBS-Puffer, 1% NP-40
PBS-Puffer-FCS	PBS-Puffer, 0.1% NP-40, 5% FCS
Proteingellaufpuffer pH8.3	33 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1% SDS
Proteingelladepuffer (2x)	5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8); 4 ml 20% SDS; 1 ml 2-Mercaptoethanol; 4 ml 50% Glyzerin; 0,004 g Bromphenolblau; 6 ml A.bidest.
Proteingelladepuffer (6x)	1x Tris/SDS pH 6.8, 3% SDS, 3% 2-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau
Proteindialysepuffer	500 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT
RNA-Probenpuffer	10 ml Formamid; 3,5 ml 37% Formaldehyd; 1 ml 10x MOPS (2:1 einsetzen)
RNA-Ladepuffer (10x)	50% (v/v) Glyzerin; 1 mM EDTA; 0,4% (w/v) Bromphenolblau in DEPC-H ₂ O
Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8.9

Kathodenpuffer	100 mM Tris; 100 mM Tricin; 0,1% (w/v) SDS
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57,1 ml Eisessig auf 1 l A.bidest.
Tricinegelpuffer	3.0 M Tris, pH 8.45, 0.3% SDS
TBS-T-Puffer	150mM Tris/HCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween [®]
TE-Puffer pH 8.0	10mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0
Towbin-Puffer	3 g/l Tris, 14.4% g/l Glycin, 200 mM Methanol in A. dest.

2.1.7. Chemikalien

Aceton, Borsäure, Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Coomassie®Brillantblau G250, Chloroform, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure (EGTA), Glucose, Glycin, Glycerin, Isopropanol, Kaliumacetat, Lithiumchlorid, Methanol, 2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumazid, Natriumchlorid, Nonidet P-40 (NP-40), Phenol, Phenol/Chloroform, *o*-Phosphorsäure, Rotiphorese® Gel30 (30%ige Acrylamidstammllösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1), Salzsäure (HCl), verschiedene Salze, Trichloressigsäure (TCA), TritonX-100, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Tricin), Tris, Tween-20 (Roth)

Agar, Bactopepton, Baktotrypton (DIFCO)

Glutathion reduziert, HEPES, IGEPAL (SIGMA)

Ammoniumpersulfat, Ampicillin, Bromphenolblau, Coomassie-Blue R250, TEMED, Tween 20, Triton X 100 (SERVA)

Agar, Ampicillin Natriumsalz, Diethanolamin, Dimethylsulfoxid (DMSO), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-N,N,N'N'-tetraessigsäure (EGTA), Igepal-CA630, Natrium-*o*-vanadat, 4',6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), Mineralöl, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), Paraformaldehyd, Protein G-Sepharose, *p*-Phenylendiamin, Propidiumiodid, reduziertes Glutathion, Thymidin (Sigma-Aldrich)

EDTA, Glycin (MERCK)

ATP, Proteaseinhibitoren (ROCHE)

IPTG, X-GAL (BTS)

dNTP, Glutathionsepharose[®] 4B, NHS-activated Sepharose (AMERSHAM PHARMACIA)

Agarose, Glutamin, Penicillin, Streptomycin (LIFE TECHNOLOGIES)

Skim Milk Powder (BECTON/DICKINSON)

Fötales Kälberserum (BIOCHROM)

2.1.8. Standards

DNA-Größenstandard pBR322 DNA/*Alu*
 λ DNA/*Eco*47III/*Eco*91I (MBI FERMENTAS)

Kaleidoskop-Proteinstandard (BIO-RAD)

MultiMark[®] Multi-Colored Standard (INVITROGEN)

2.1.9. Enzyme

Taq DNA-Polymerase (ROCHE)

Pwo DNA-Polymerase (AGS)

SuperSkript[™] II RT (Invitrogen)

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase (Invitrogen)

Pfu Turbo[®] DNA Polymerase (Stratagene)

T4 DNA Ligase (Invitrogen)

Sawady *Taq* DNA Polymerase (PeqLab)

PowerScript[™] Reverse Transcriptase (BD Clontech)

2.1.10. Filme, Filter und Geräte

KODAK X-OMAT (KODAK)

Gene Genius, Bio Imaging System (SYNGENE)

Whatman-Filterpapiere (SIGMA)

Nitrocellulose-Membran Protran BA 83 (SCHLEICHER&SCHÜLL)

Immobilon-P PVDF-Membrane (MILLIPORE)

Biofuge fresca (HERAEUS)

Geltrockner (SAVANT)

IG150 CO₂-Brutschrank (JOUAN)

Horizontale und vertikale Gelelektrophoreseapparatur (BIO-RAD)

Vertikale Proteingelkammer (BIOMETRA)

Labor-Rotationsschüttler (INFORS)

Laborzentrifuge 4K10 (SIGMA)

Luminoscan TL Plus (LABSYSTEMS)

BX51 System-Mikroskop (OLYMPUS)

Steril- und Sicherheitswerkbank (HERAEUS)

Thermomixer (EPPENDORF)

PCR-Gerät RoboCycler 40 (STRATAGENE)

UV/VIS-Spektrometer LB 50 (BECKMAN)

Vortex Genie-2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

EL Series Ultraviolet Hand Lamps (UVP)

2.1.11. Antikörper

2.1.11.1. Primärantikörper

Tab. 5 : In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Klon	Anwendung (Verdünnung)
Kaninchen anti-TopBP 1	HKI	polyklonal	WB (1:10000)
Kaninchen anti-TopBP 1	Novus Biologicals	polyklonal	WB (1:10000)

Kaninchen anti-cdk-1	Santa Cruz	polyklonal	WB (1:500)
Kaninchen anti-E2F-1	Santa Cruz	polyklonal	WB (1:250)
Kaninchen anti-Egr-1	Santa Cruz	polyklonal	WB (1:500)
Anti Histon H3	AbCam	polyklonal	IP(1 :50)

Miz-1 monoklonaler Antikörper (11E4), Maus

2.1.11.2. Sekundärantikörper

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Konjugation	Anwendung (Verdünnung)
Ziege anti Kaninchen	DIANOVA	Cy-3	IF (1:50)
Ziege anti Maus	DIANOVA	FITC	IF (1:50)
Ziege anti Kaninchen IgG	DIANOVA	HRP	WB (1:10000)
Ziege anti Maus IgG	DIANOVA	HRP	WB (1:10000)

2.1.12. Kits

DNeasy™ Tissue Kit (PROMEGA)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (PROMEGA)

NucleoBond® Plasmid Kit AX100, AX 2000 (CLONTECH)

NucleoSpin® Extraktion Kit (CLONTECH)

ECL⁺ Western Blotting Detection Kit (AMERSHAM PHARMACIA)

RNAi Starter Kit (QIAGEN)

Quiaex Gel-Extraction Kit (QIAGEN)

QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)

Topo TA Cloning® Kit (INVITROGEN)

NucleoSpin® RNA II (MARCHERY-NAGEL)

Oligotex® mRNA Mini Kit (QIAGEN)

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (AMERSHAM)

2.2. Methoden

2.2.1 Transformation von *Escherichia coli* nach Hanahan

Hanahan (1983)

2.2.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit dem *E.coli*-Stamm DH5 α beimpft und bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm über Nacht kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml Hauptkultur geshiftet. Dem Hauptkulturmedium wurden 10 mM KCl und 20 mM MgSO₄ zugesetzt. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 auf dem Rotationsschüttler bei 37°C herangezogen. Die Hauptkultur wurde 5 min bei 2000 x g pelletiert und auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 15 ml eisgekühlter TFB I-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2000 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml eisgekühlter TFB II-Lösung resuspendiert und in vorgekühlte Eppendorf-Tubes zu 200 μ l aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2. Transformation

Aliquotierte kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 10-20 μ l der gewünschten Plasmid-DNA hinzugegeben. Diese Suspension wurde vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock der Zellen für 45 sec. bei 42°C und die nachfolgende Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 60 min bei 37°C geschüttelt. Es wurden unterschiedliche Volumina des Transformationsgemisches auf selektivem Medium, dem die entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)

1 ml Bakterienkultur wurde in ein 1.5ml Eppendorf-Tube überführt und in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l Lösung I resuspendiert. Unter leichtem Schütteln der Suspension und Zugabe von 200 μ l Lösung II erfolgte die Lyse der Zellen. Durch Zugabe von 200 μ l Lösung III und 5 min Inkubation auf Eis wurden Proteine, chromosomale DNA und Lipide gefällt. Die Lysis-Suspension wurde 5 min bei

maximaler Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde zur Fällung der Nukleinsäuren mit 0.6-fachem Volumen Isopropanol versetzt und kurz geschüttelt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden bei 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl A. bidest. gelöst. Durch Zugabe von 200 µl 9M LiCl und 15 min Inkubation bei –20°C wurden verbliebene Proteine ausgesalzen und mittels Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde erneut mit 0.6-fachem Volumen Isopropanol versetzt, kurz geschüttelt und die Nukleinsäuren 15 min bei 4°C und 13000 rpm gefällt. Das Präzipitat wurde kurz mit 70%igem Ethanol und anschließend mit 96%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA (Midi- und Maxipräp)

Zur Isolierung größerer Mengen DNA aus Bakterienkulturen von 25 ml bzw. 800 ml wurde NukleoBond AX100 bzw. AX2000 Kit von CLONTECH nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

2.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Die Angaben für die Lösungen 1-3 entsprechen einem Kulturvolumen von 100 ml. Die Übernachtskultur wird bei 5000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 10 ml Lösung 1 vollständig resuspendiert. Anschließend erfolgt die Lyse der Zellen durch Zugabe von 20 ml Lösung 2 und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine, chromosomale DNA und Lipide wurden im Anschluss durch Zugabe von 15 ml Lösung 3 und einer Inkubation auf Eis für 20 Minuten gefällt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm wurde der Überstand vom weißen flockigen Niederschlag getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde anschließend mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und für 20 Minuten zentrifugiert. Die dadurch gefällte DNA wurde nach dem Verwerfen des Überstandes mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und für weitere 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde in 500 µl A. bidest. aufgenommen. Verbliebene Proteine und andere Verunreinigungen der Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von einem Volumen 9M LiCl und einer Inkubation von 60-120 Minuten bei –20°C ausgesalzen. Im Anschluss wird der Ansatz für 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die im Überstand befindlichen Nukleinsäuren werden durch Zugabe von einem Volumen 96% Ethanol

und anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in 200-500 µl A. bidest. aufgenommen

2.2.5. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde durch Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (AMERSHAM) nach Herstellerempfehlung durchgeführt.

2.2.6. Bearbeitung von Plasmid-DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen, die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Ligationen, Dephosphorylierungen und andere enzymatische Reaktionen wurden nach Empfehlungen der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1998) durchgeführt. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in 20µl Ansätzen durch T₄-Ligase und spezifische Puffer realisiert.

2.2.7.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurden folgende Standardansätze und PCR-Programme verwendet:

- 1) 1 µl Template
- 1 µl Primer 1 (100 pmol)
- 1 µl Primer 2 (100 pmol)
- 10 µl Polymerasepuffer (10-fach)
- 10 µl dNTP's (2 mM)
- 5 µl DMSO
- 0.5 µl Polymerase (500 Units)
- 71.5 µl A. bidest.

Programm:	25 Zyklen	30 sec.	94°C
		30 sec.	42°C
		1 min	72°C
	1 Zyklus	5 min	72°C

- 2) 1 µl Template
1 µl Primer 1 (100 pmol)
1 µl Primer 2 (100 pmol)
5 µl Polymerasepuffer (10 fach)
5 µl MgSO₄ (25 mM)
2 µl dNTP's (2 mM)
5 µl DMSO
1 µl Polymerase
79µl A. bidest.

Programm:	1 Zyklus	10 min	96°C
	30 Zyklen	1 min	96°C
		1 min	68°C
		2 min	72°C
	1 Zyklus	10 min	72°C

Die PCR-Reaktionen wurden am Robocycler von STRATAGENE durchgeführt.

2.2.7.2 zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese der TopBP1 Konstrukte wurde über den „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma STRATAGENE realisiert. Das PCR-Protokoll wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.3.2. dargestellt.

2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Für die Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen wurde der Nucleospin RNAII-Kit von BD Clontech verwendet. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Die präparierte RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge im Spectrophotometer und durch Elektrophorese auf Reinheit und Konzentration überprüft. Bei –80°C wurde die RNA für kurze Zeit in A. bidest. gelagert. Für längere Aufbewahrung wurde die RNA mit 3 M NH₃-Acetat und 4 Volumen Ethanol in Fällung bei –80°C gelagert.

2.2.9. Elektrophorese von RNA

Das für die Lösungen verwendete A. bidest. wurde mit 0,2% (v/v) DEPC über Nacht vorbehandelt und autoklaviert. Die Gelkammer und die verwendeten Gelschlitten wurden für 30 min mit einer 3%igen H₂O₂-Lösung behandelt und anschließend mit DEPC-A.bidest. gespült.

Für die Gele wurde 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die gereinigten Gelschlitten gegossen. Es wurden 0,5 µg RNA mit 2 Volumen Probenpuffer gemischt und durch Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.10. Präparation von mRNA aus Total-RNA

Es wurde mit dem Oligotex[®] mRNA Mini Kit von QIAGEN gearbeitet. Die Präparation wurde nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.11. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde die Reverse Transcriptase PowerScript[™] (BD Clontech) verwendet und nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Dazu wurden 2,5 µg Gesamt-RNA mit DEPC- behandeltem A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt 1 µl (0,5 µg/ml) Oligo-dT(15)-Primer (Promega) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Für jede Reaktion wurden folgende Bestandteile eingesetzt:

- 11 µl RNA-Primer-Mix
- 4 µl 5x Erststrangsynthesepuffer
- 2 µl 100 mM DTT
- 2 µl 10 mM Desoxynukleotide (dNTPs)
- 1 µl PowerScript Reverse Transcriptase

Die Ansätze wurden für 70 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 15 min abgestoppt.

2.2.12. Zellkultur

HeLa-Zellen und HeLa-S3 Zellen wurden adhärent als Monolayer in Plastikgewebekulturflaschen und -schalen bei 5% CO₂, 96% relativer Luftfeuchte und 37°C im Brutschrank kultiviert. Als

Kulturmedium wurde DMEM mit Glutamax I™ komplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min) und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

Zur Kultivierung von Ls174T-Zellen wurde RPMI-1640 mit Glutamax I™, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% w/v Trypsin/2 mM EDTA) abgelöst. In regelmäßigen Intervallen wurden die Kulturen mittels DAPI-DNA-Färbung fluoreszenzmikroskopisch auf Mycoplasmen-Kontaminationen untersucht.

2.2.12.1. Transiente Transfektion von HeLa-Zellen durch Kalziumphosphatpräzipitation

nach Wigler et al. (1978)

Die Menge an DNA, die für die Kalziumphosphatmethode eingesetzt wurde, richtete sich nach der Größe des Kulturgefäßes. Es wurden 2 µg DNA pro cm³ Kulturgefäß verwendet. Damit im Medium eine konstante DNA-Menge vorliegt, wurden die Ansätze mit leerem Expressionsvektor aufgefüllt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde dem Ansatz ein GFP-Expressionsplasmid zugesetzt. Jeder DNA-Ansatz wurde mit 25 µl 2.5 M CaCl₂ versetzt und mit bidestillierten Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Durch langsames Zugeben von 2x HBS-Puffer und gleichzeitiges Einblasen von Luft wurde die Präzipitatbildung ausgelöst. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die bis zu 50% konfluenten Zellen gegeben. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Medium mit dem Transfektionsansatz entfernt, die Zellen wurden 3x mit 1x PBS gewaschen und neues Medium zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet oder weiterführenden Experimenten zugeführt.

2.2.12.2 Transfektion mit RNAi-Fect

Ls174T-Zellen wurden stabil mit RNAiFect™ nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Dazu wurden die Zellen einen Tag zuvor auf 6 cm Platten ausplattiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90% konfluent waren. Es wurden 4 µg siRNA eingesetzt. Das Verhältnis vom Transfektionsreagenz zur eingesetzten Menge der siRNA betrug 1:9. Am darauffolgenden Tag bzw. 48 Stunden danach wurden die Zellen geerntet.

2.2.13.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die HeLa-Zellen wurden auf mikroskopischen Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Die Transfektion wurde nach 2.2.10.2. durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 3.7% Paraformaldehyd 15 min fixiert und 2x mit PBS/Glycin gewaschen. Anschließend wurden die HeLa-Zellen durch 10 min Inkubation mit PBS/NP40 permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Bindestellen mit PBS/NP40 und 5% FCS bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Zellen 45 min mit dem 1:50 verdünnten Primärantikörper bei 37°C in einer dunklen Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte 3-maliges Waschen mit PBS/NP40 für 5 min. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1:50 mit PBS/NP40/FCS verdünnt und für 45 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Es wurden FITC bzw. Cy3 gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Zum Anfärben der Kernkompartimente wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung (100 µg/µl) durchgeführt. Zuletzt wurden die Zellen 3x mit PBS/NP40 gewaschen und durch Mounting Medium vor Austrocknung auf dem Objektträger geschützt. Das Erstellen der Fluoreszenzbilder erfolgte an dem BX51-Systemmikroskop (OLYMPUS). Die Bearbeitung der Bilder wurde durch das analySIS[®] Programm von SIS realisiert.

2.2.13.2. Test auf Mycoplasmen

Um sicherzugehen, dass die in Kultur gehaltenen eukaryotischen Zellen nicht mit Mycoplasmen infiziert sind, wurde in regelmäßigen Abständen eine DAPI-Färbung vorgenommen. Dazu wurden Zellen abtrypsinisiert und in 2 verschiedenen Zelldichten auf einer neuen Kulturplatte mit Deckgläschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 20 min mit 3 ml Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und durch 2 ml DAPI-Lösung ersetzt. Die DAPI-Lösung wurde 1:1000 in PBS verdünnt. Die Zellen wurden 5 min mit dieser Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Mit Hilfe von Antifade wurde das Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

2.2.14. Proteinbestimmung

nach Bradford, (1976)

Der Proteingehalt der Zell-Lysate wurde nach der Methode von Bradford bestimmt.

2.2.14.1. TCA-Fällung

Die TCA-Fällung wurde zum vorreinigen für spätere Proteinanalysen verwendet. Die Proteine wurden mit 10%iger Trichloressigsäure (TCA) bei -20°C gefällt. Die im Überstand enthaltenen Kontaminationen (z.B. Salze, Nukleinsäuren, Lipide, Lösungsmittel, etc.), wurden nach dem Abzentrifugieren der Proteine verworfen. Die Methode eignet sich auch für geringe Proteinkonzentrationen $>5\mu\text{g/ml}$.

2.2.14.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die nach 2.2.10.2. transfizierten Zellen wurden mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 1 ml PBS/DTT zugegeben und die Zellen mittels eines Gummischabers abgekratzt. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Tupe überführt und abzentrifugiert. Dem Pellet wurden 200 μl NP40-Puffer + Proteaseinhibitor zugegeben. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert und bei $2000 \times g$ (15 sec.) abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit Proteigel-Ladepuffer versetzt und die Proteine bei 95°C für 10 min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem 8%-igen SDS-Gel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant-Blau G250 gefärbt oder im Western Blot analysiert. Zur Coomassiefärbung wurde das Gel für 30 min in Proteingelfärbelösung geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.2.14.3. Western Blot (nach Towbin *et al.*, 1979)

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Gel wurden diese durch Semi-Dry-Blotverfahren (BIO-RAD) auf eine Nitrocellulose- oder eine PVDF-Membran bei 4 mA/cm^2 transferiert. Im Fall der PVDF-Membran wurde diese zunächst mit 100% Methanol benetzt (1 min), in A.bidest gespült (2 min) und zusammen mit dem Gel und Whatman-Papier in Towbin-Puffer getränkt.

Nach dem Blotten wurde die Membran in 5% Magermilch/TBS/T-Puffer zur Absättigung der unspezifischen Bindungen für 2 Stunden geschwenkt. Der Primärantikörper wurde 1:50 bis 1:2000 in 5 % Magermilch/TBS/T-Puffer verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 3x mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit dem an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper wurde zuvor 1:2000 in 5 % Magermilch/TBS/T-Puffer verdünnt. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit TBS/T-Puffer wurde die Detektion mit Hilfe des ECL⁺-Western

Blotting Detection System (AMERSHAM) durchgeführt und auf KODAK X-OMAT Film festgehalten.

2.2.14.4. Stripping von Western-Blots

Zur Detektion von unterschiedlichen Proteinen auf einer PVDF-Membran, können Antikörper nach der ersten Behandlung wieder entfernt werden. Dies geschieht mittels einer Strip-Lösung. Hierzu wird die Membran in der Lösung auf 55°C für 30 min erwärmt und geschüttelt. Im Anschluß wird sie einige Male intensiv mit PBS gewaschen. Für die zweite Antikörperdetektion muss die Membran nun von Neuem geblockt werden.

2.2.14.5. Messung der Luziferaseaktivitäten von Zellextrakten

Die Zellen wurden mit eiskalten PBS-Puffer gewaschen und nach dem Passive Lysis of Cells-Protokoll des Dual-Luciferase[®]Reporter Assay System (PROMEGA) lysiert und gelagert. Über diesen Kit erfolgte auch die Auswertung der Zellysate.

2.2.15. Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation zum *in vivo* Nachweis von an die DNA gebundenen Proteinen wurde prinzipiell nach der Methode von O'Neill und Turner, 2003 durchgeführt.

Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Das „cross-linking“ der Proteine zur DNA erfolgte in 15 cm-Kulturplatten mit 0,75% Formaldehyd-Lösung für 10 min bei 37°C. Anschließend wurden die Kulturplatten 2x mit PBS gespült. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen, abgeschabt und in 1.5ml Eppendorfgefäße überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde das Zellpellet in ChIP-Lysispuffer aufgenommen und mit Ultraschall behandelt (10 sek. Impulse, 15x bei geringer Pulsintensität). Danach wurde der DNA-Gehalt der Proben ermittelt.

Die für die Immunopräzipitation verwendeten 20µl Protein A/G Beads wurden einen Tag vorher mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (1200xg, 5 min bei 4°C). Das Blocken der Beads (zum Absättigen der unspezifischen Bindekapazität) erfolgte mit 3% Perfect-Block in PBS Lösung über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4°C. Im Anschluss wurden die Beads abzentrifugiert

(1200xg, 5 min bei 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zelllysat wurde zunächst mit äquibrierter und geblockter Protein-A/G-Sepharose für 30 min bei 4°C inkubiert (*Preclearing*), um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert und das Volumen an vorbehandeltem Zelllysat abgenommen.

Die Immunopräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C. Dazu wurden die Proben mit einem Puffer auf einen gleichen DNA-Gehalt eingestellt und der spezifische Antikörper hinzugefügt. Ein Ansatz ohne Antikörper diente als Ladekontrolle. Am folgenden Tag wurden zu den Ansätzen 20µl der geblockten Protein A/G Sepharose zugefügt und diese für weitere 2 Stunden auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde bei 1200xg für 5 min abzentrifugiert, der Überstand der Probe ohne Antikörper wurde bei –20°C gelagert und die restlichen Überstände verworfen. Die Präzipitate wurden dreimal mit 1 ml Waschpuffer und einmal mit finalem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Die Elution des gebundenen Chromatins erfolgte durch Zugabe von 450µl Elutionspuffer und Inkubation für 15 min auf einem Überkopfschüttler. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Eluate und die Ladekontrolle wurden mit 5µl Proteinase K (20mg/ml) versetzt und für 4-5 Stunden bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH5,3), 2 Volumen Ethanol und 10µl Glycogen (5mg/ml) versetzt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei –20°C. Nach Zentrifugation (13000 rpm für 10 min) wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 80µl TE Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

2.2.16. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Durch diese Methode ist es möglich, einen Überblick über das Proteom von Zellen zu erhalten und Veränderungen zu analysieren. Für die Zellextrakte, die in der 2D-Gelelektrophorese analysiert wurden, sind HeLa Zellen verwendet worden. Die Zellen wurden in 2D-Lysispuffer aufgenommen und nach einer Ultraschallbehandlung einer TCA-Fällung unterzogen, um Verunreinigungen zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Proteinkonzentration mittels einer Bradfordbestimmung ermittelt.

2.2.16.1. Herstellen der 2D-Polyacrylamidgele

Die Gelkassetten sind mit 1mm dicken Abstandshaltern versehen, die der späteren Dicke des Gels entsprechen. Zum Gießen der Gele wurde der zum Ettan DALT*twelve*TM System gehörige Gießstand

verwendet, der es ermöglicht, 14 Gele parallel zu gießen. Die Acrylamidlösungen wurden nach Protokoll erstellt und in den Gießstand gegossen. Um Luftblasen in den Gelen zu vermeiden, werden bei diesem System die Gele von unten gegossen und mit einer Glycerin Lösung (Displacing-Solution) unterschichtet. Damit auch die Oberkante eines Gels möglichst eben ist, wurden die Gele mit einer Wasser-gesättigten Butanol-Lösung überschichtet. Die Gele wurden zum Polymerisieren über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

Mengenangabe für 6 Gele:

187.5 ml	Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)
112.5 ml	1.5 M Tris pH 8.8
450 mg	SDS
145 ml	Aqua bidest
4.5 ml	10% APS
62.5 µl	TEMED

2.2.16.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

In der Isoelektrischen Fokussierung, die die erste Dimension der 2D-Page darstellt, werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Verwendet wurden hierzu IPG-Strips (immobilized pH gradient) mit dem pH Bereich von 3-10. Diese wurden im RH-Puffer mit den entsprechenden Ampholyten über Nacht rehydriert. Beladen wurden die Streifen durch das sogenannte „cuploading“ mit 300µg Proteinextrakt. Die Auftrennung erfolgte auf dem Multiphor System von Amersham. Das dafür verwendete Programm ist in Tabelle X dargestellt.

IPG pH 3-10	
Voltzahl in V	Dauer in h
150 (halten)	2
150-300 (Gradient)	2
300-600 (Gradient)	1.5
600-1200 (Gradient)	1
1200-2400 (Gradient)	1
2400-3500 (Gradient)	1

3500 (halten)	16
Gesamt : 61.4 kVh in 24.5h	

Tab. 7 Parameter der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension)

Es wurden bei dem Programm sowohl konstante Voltzahlen verwendet (halten), als auch Gradienten (Gradient).

2.2.16.3. SDS-PAGE

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen zunächst 15 Minuten in DTT-Puffer und anschließend in IAA-Puffer (**I**odacetamid) äquillibriert. Die Streifen wurden auf das SDS-Gel aufgebracht und mit 0,1% Agarose überschichtet. In die linke obere Ecke des Gels wurde zusätzlich ein mit Proteinmarker (Benchmark Ladder, Invitrogen) getränktes Filterpapier gelegt, um einen Größenrichtwert der Spots zu erhalten. Die Gele wurden bei 4 Watt für 20-24 Stunden laufen gelassen. Während dieser Zeit wurde der Elektrophorese-Puffer durch eine Kühlapparatur bei konstanten 20°C gehalten. Die Proteine wurden so ihrem Molekulargewicht entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.16.4. Kolloidale Coomassie-blue Färbung

Die kolloidale Coomassie-blue Färbung (Roti-blue, Roth) ist empfindlicher als eine herkömmliche Coomassie-Färbung und erreicht fast die Sensitivität einer Silberfärbung.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese in eine Fixierlösung gegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur darin geschwenkt. Die Roti-blue Färbelösung wurde frisch angesetzt und die Gele darin überführt. Die Färbung erfolgte unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur. Die Farbstoffreste wurden am folgenden Tag durch Spülen mit Aqua bidest. entfernt.

2.2.16.5. Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Färbemethode, bei der auch kleinste Proteinmengen noch sichtbar angefärbt werden. Sie erfolgte mittels eines Kits der Firma Invitrogen und wurde dem Protokoll des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.16.6 Auswertung der 2D-Gele

Die gefärbten 2D-Gele wurden mit Hilfe des Typhoon Scanners der Firma Amersham Bioscience und der Scanning-Software „MagicScan 4.6“ (Amersham Bioscience) aufgenommen. Die erhaltenen digitalen Bilder wurden mit Hilfe der Proteinanalyse-Software „Melanie 4“ bearbeitet und ausgewertet. Den Spots konnte dadurch unter Zuhilfenahme des mitgelaufenen Proteinstandards ein Molekulargewicht zugeordnet werden. Bei Proteinspots auf verschiedenen 2D-Gele (z.B. siRNA-Versuche) konnten so Konzentrationsunterschiede und veränderte Expressionsmuster analysiert werden.

2.2.16.7. Stechen der Spots und Dot-Blot

Für die Spot-Analyse mittels der Dot-Blot Technik wurden nur silbergefärbte Gele verwendet. Die Proteinspots wurden mit Hilfe des Spotpickers der Firma Amersham Bioscience gestochen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgelegt. Das Entfärben erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen). Die Gelspots wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,25M Tris-HCl Lösung (pH 6.8)/0.1% SDS versetzt und unter Schütteln über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Gelstücke bei 13000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer feinen Nadel abgenommen und auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Die Membran wurde im Anschluß in 5% Trockenmilch über Nacht geblockt. Die Antikörperdetektion wurde dem Standardprotokoll (s.o.) entsprechend durchgeführt. Der verwendete TopBP1 Antikörper wurde in einer 1:10000 Verdünnung in 5%Trockenmilch in TBS-T-Puffer eingesetzt.

2.2.17. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Es wurde als Grundlage der Kit von Molecular Probes verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Oligonukleotide nicht radioaktiv, mit Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden müssen, sondern die DNA im Gel mit SYBR-Green gefärbt werden kann. Die Einzelstrangoligonukleotide wurden von MWG synthetisiert und durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten und eine Inkubation auf Eis für weitere 5 Minuten zu Doppelstrangoligonukleotiden verbunden.

Sequenz des Oligonukleotids:

5'-CTT TGG GGT AGG GGC GCC GAG TCG GGG GAG GGG GCT GTG CGC C-3'

Das verwendete Oligonukleotid beinhaltet die Sequenzen von beiden EGR-1 Bindestellen der TopBP1 Promotorregion.

2.2.17.1 Herstellung der Zellysate für den EMSA

Für das Baculovirus-Expressionssystem wurde die Insektenzelllinie Sf-9 (Intestinalzellen von *Spodoptera frugiperda*) IPLA-Sf21-AE verwendet. Das verwendete Egr-1 Expressionsplasmid beinhaltet die gesamte kodierende Sequenz des humanen Egr-1 in dem 9755bp großen Vektor pBSV-8His. Durch homologe Rekombination zwischen dem Vektor und der viralen DNA entstanden Viren, die in der Lage sind, das humane Egr-1 in der Wirtszelle zu exprimieren. Diese Egr-1-Viren wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Christine Skerka (Abt. Infektionsbiologie, HKI-Jena) zur Verfügung gestellt.

Die erwähnten Sf9-Zellen wurden in Insect-Xpress-Medium (BioWhittaker) mit 4% hitzeinaktivierten FCS (PAA Laboratories GmbH), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (BioWhittaker) und 0,1% Fungizone (Amphotericin B, GibcoBRL™) kultiviert. Die Anzucht erfolgte bei 27°C und 95% Luftfeuchtigkeit.

Für die Expression des rekombinanten Proteins wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 60-70% nach dem Ersatz des Mediums durch Kulturmedium ohne Zusatz von FCS mit rekombinanten Viren bei einer MOI (multiplicity of infection) von 5-7 infiziert. Für die Proteinexpression wurden die Zellen für 3 Tage bei 27°C im Brutschrank bis zur Ernte inkubiert. Zur Gewinnung der Ganzzellextrakte wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und bei 300 x g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde 1x mit 50 ml eiskaltem PBS gewaschen und im Anschluss in 800µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in hypotonem RSB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis zum Quellen gestellt. Die Zellen wurde bei 14000 rpm für 10 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Puffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerin, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF) aufgenommen und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Zell-Lyse wurde bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Proteine bei -70°C gelagert.

2.2.17.2 Gelretardation

Für den Beweis einer Protein-DNA-Interaktion wurden im nativen Gel die Laufverhalten von ungebundener DNA gegenüber dem retardierten Laufverhalten der Protein-DNA-Komplexe verglichen. Hierzu wurde das rekombinante Proteinlysate mit den Oligonukleotiden in einem Bindepuffer (MgCl_2 , 2.5mM EDTA, 2.5mM DTT, 250mM NaCl, 50mM Tris-HCL (pH 7.5)) für 20 Minuten inkubiert. Als Kontrolle wurde anstelle des rekombinanten Proteinlysates ein Zell-Lysat aus infizierten Sf-9 Zellen verwendet, bei denen die zur Infektion verwendeten Viren kein Plasmid für die Expression von Egr-1 enthielten. Für den sogenannten „Supershift“ wurde das rekombinante Proteinlysate vor der Inkubation mit den Oligonukleotiden mit einem gegen Egr-1 gerichteten Antikörper behandelt.

Für die Auftrennung der Probe wurde ein natives Polyacrylamidgel gegossen. Als Lauf- und Gelpuffer diente TBE (10x TBE-Puffer: 107.80g Tris; 55g Boric acid; 7.44g EDTA-2H₂O). Nach einem Gelvorlauf von 20 min bei 60 V wurde das Gel beladen und die Proben bei 80 V ca. 4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte das Färben der DNA durch SYBR-Green. Dazu wurde die SYBR-Green Stammlösung (Molecular Probes) 1:10000 in 0.5x TBE Puffer verdünnt und das Gel darin für 20 Minuten gefärbt. Im Folgenden wurde das Gel 2x kurz mit A. bidest. gewaschen und auf einem UV-Transilluminator erfolgte die visuelle Auswertung.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des TopBP1 Promotors : Identifizierung von interagierenden Transkriptionsfaktoren

Das Gen von TopBP1 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 3q21-q23 und besteht aus einem ORF von 5298 Basenpaaren. Der Startpunkt der Translation befindet sich im zweiten Exon des Gens, demgegenüber ist der Startpunkt der Transkription noch nicht endgültig bekannt. TopBP1 gehört zu der Minderheit der sogenannten TATA-losen Promotoren, denen die TATA-Box, deren Abstand zum Startpunkt der Transkription relativ konserviert bei –25 bp ist, fehlt. Eine genauere Bestimmung des Startpunktes durch Methoden wie 5'-RACE und Primerextension hat in der Vergangenheit nur zu unbefriedigenden und häufig widersprüchlichen Ergebnissen geführt. In der Literatur wird der größte cDNA-Klon als Startpunkt der Transskription festgehalten (Yamane et al., 1997). Dieser Startpunkt (GenBank: NM 007027) diente als Grundlage für die Analyse des Promotors in dieser Arbeit und der Suche nach *cis*-aktiven Elementen.

3.1.1. Suche nach Bindestellen von Transkriptionsfaktoren

Durch die nähere Charakterisierung des Promotors, seine Regulation und Beeinflussung durch Transkriptionsfaktoren, sollte die Funktion von TopBP1 in den DNA-damage checkpoints und der Schadensantwort einer Zelle auf UV vertiefend untersucht werden. Das Hauptaugenmerk bei der Suche lag bei *cis*-aktiven Regionen, die in der Literatur bereits mit ähnlichen Funktionen in Verbindung gebracht wurden.

Für die Datenbankanalyse wurde die DNA-Region zwischen den Basenpaaren von –827 bis +155 des TopBP1 Promotors ausgewählt. Diese beinhaltet das komplette erste Exon von TopBP1 und weitere 83 Basenpaare des ersten Introns (siehe Abb.5). Diese Sequenz wurde mit der PromoterInspector software (Genomatix Software GmbH, München) verarbeitet und analysiert. Dieses Programm sucht in einer DNA-Sequenz nach distinkten Motiven die in eukaryotischen Promotoren mit großer Häufigkeit auftreten. Die Analyse ergab, dass sich in der Position –200 bis +96 ein Promotor befindet. Der vorhergesagte Promotor schließt, ausgehend von dem in der Literatur festgehaltenen Transkriptionsstart, das gesamte erste Exon und 24 bp des ersten Introns mit ein. Die Promotoranalyse wurde mit einem zweiten Programm (Gene2Promoter, Genmatix Software GmbH, München) wiederholt. Auch diese Auswertung führte zu einem Promotor in der angegebenen Position.

-827
TopBP1 human TTATCCC CTCTCCCTTT GCTCTCTGCC ATCTGAATCT TAGGTTTCAGT CCCAGAATCT CCCAGTACT
GAGGCAGATG CAGAGAAAAGA GAACGGCGAT GTCCACTGAA GGGGAGGAGG AGGGGAGACC ATTGAAGATC
TTGACAAAGA TCCCTTTGCA TTAGCTGTGT AATAAGTCAT CCTTCTTCC CTTGCCATCT TGTGGCTGTG
TTAGGCGGTG ATTCTATTCC TGCTGTGTG GAGGGAAACC ACCCAGTCCG TAGTCAGAAG ACCTGGATGC
AGTATTAATT CTACCACCTA CTAGCCGTGT GCCCTGAAC CCATCATTTA ACTTCCTCCG TTTTACATC
TACAAAATGG AACTACCACT ATTTGCCTCA CGGAATTGTT TTGGATAATA CCTTTTCCCG TGCATGCCTG
GTATAAGACA GGTGTAAAAT AAATATCTAT TGAGGAAATC CTTTCTTCC CTGGCTTTT TAACAGTAAA
GGAGTATTCC TGGCCTGTGG TCCTACCTCT TGAACCGACG GCGCTGGGCC TACTCGCAGC GGAGACTAGG
CCCGCCAGC AAAGCCCTAA ACCCAAAGGG TCCGGCCCAA GCTTTCCTG AAGCCCCACC GCCCACAGAC

-200
TGCTCACCTC CACGTTTGAC ATTTCCGCTC TTCTGCTGCA GCTGCCGATG GCGTCACTTC CACCGGAAAA

GGCAAGCGCG GCCGCGCGGT TGGCGCGAAA GTCGGTTCCC GTTCTGGGCA ATTTCCGGGT TCTCCAGCGT

TTGCTTTGGG GTAGGGGCGG CGCCGAGTCG GGGGAGGGGG CTGTGCGCCG GGCTGGCGCC **CGACCCCAGC**

CACCGCCCTG CGGCCAGCGC GTCCCCCGAC TCGCCGCCCG GAGACCCCGA GGCTCCAACG AGGTAAAGTGA

Exon 1

GGCGCGGAGT GGGGACACAG CTCCTCCCA GCCCAACTG GGGTTCGCGA TGCCTTCTGT

GGCCTTCAGG ACCCT
+ 155

Abb. 5 Promotorregion von TopBP1

Diese Region hat eine Länge von 982bp und enthält das erste komplette Exon von TopBP1. In der Position -200 bis +96 befindet sich der vorhergesagte Promotor.

Im Folgenden wurde die in Abb. 5 dargestellte Sequenz nach dem Vorhandensein und der Lage von potentiellen cis-aktiven Elementen untersucht. Die Analyse erfolgte durch die MatInspector Software (Genomatix Software GmbH, München), die nach bekannten Konsensussequenzen von Transkriptionsfaktoren sucht. Als Parameter für die Suche wurde eine Übereinstimmung von mindestens 80% mit der Konsensussequenz einer Bindestelle vorausgesetzt. Die erhaltenen Transkriptionsfaktoren wurden hinsichtlich ihrer in der Literatur gefundenen Beteiligung und Funktion in DNA-Reparaturprozessen, Zellzyklusregulation und Apoptoseprozessen gefiltert und bewertet. In Abb.6 ist die Lage der Transkriptionsfaktorbindestellen in der Promotorregion von TopBP1 dargestellt.

Durch diese Computeranalyse der Promotorregion wurden zwei potentielle Egr-1 Bindestellen in der Nähe des ersten Exons (Position -19 bis -27 und -41 bis -50) von TopBP1 identifiziert. Des Weiteren wurden zwei potentielle E2F-Bindestellen gefunden, von denen die in der Position -110

bis -96 bp bereits in der Literatur beschrieben und verifiziert ist (Yoshida et al., 2004). Egr-1 und E2F sind beide, wie TopBP1 selbst, an DNA-Reparaturprozessen beteiligt.

Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 wurden gleich mehrfach in der untersuchten Sequenz gefunden. Direkt an die bereits beschriebene Bindestelle von E2F bei -110 bis -96 bp schließt sich ein Bindesequenzmotiv des Nuklear Faktor kappa B (NFκb) an. Dieser Transkriptionsfaktor wird zusammen mit Egr-1 mit der Schadensantwort einer Zelle nach UV-Stress in Verbindung gebracht (Thyss et al., 2005)

A.

Name	Wert	Region (bp)	Strang	Symbol	Sequenz
YY1	0.84	-640 bis -622	(+)	↵	ccttgCCATcttgtggctg
E2F	0.81	-430 bis -414	(-)	↞	tgcacggGAAAaggt
SP1	0.89	-273 bis -259	(-)	↵	tgctgGGCGggccta
SP1	0.89	-216 bis -202	(-)	↵	ctgtgGGCGgtgggg
E2F	0.84	-110 bis -96	(+)	↞	ttggcgcGAAAgctcg
NFκb	0.84	-96 bis -71	(+)	↞	tgGGCAatttccggg
EGR1	0.86	-53 bis -37	(+)	↞	tgggtagGGGCggcgc
SP1	0.89	-32 bis -19	(+)	↵	tcgggGGAGggggct
EGR1	0.86	-30 bis -14	(-)	↞	gggggaggGGGCtgtgc

B.

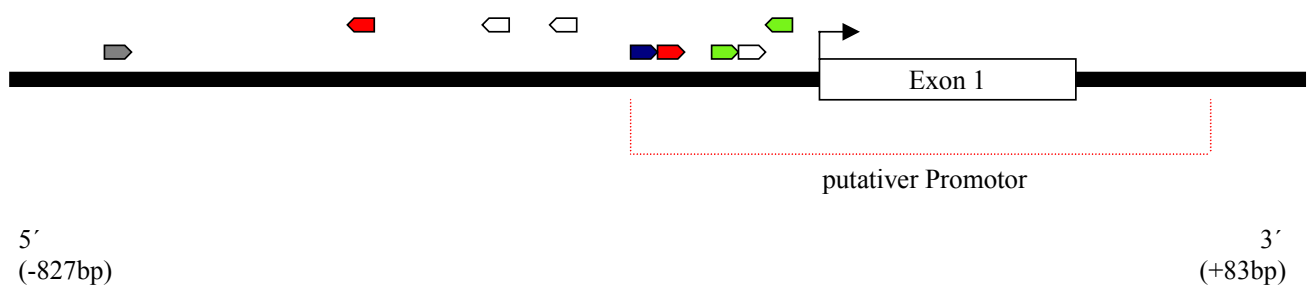


Abb. 6 Schematische Darstellung der Promotorregion

Eingezeichnet sind die potentiellen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren, die in der Literatur eine Funktion in DNA-Reparaturprozessen, Zellzyklusregulation und Apoptoseprozessen haben. Die Orientierung der Pfeilspitzen zeigt die Lage der Bindestellen auf dem +Strang (↞) bzw. dem -Strang (↵) an. Der von dem Programm „Gene2Promoter“ vorhergesagte Minimalpromotor ist in Rot dargestellt.

3.1.2. Aktivitäten der Promotorregion

Um herauszufinden, welche Regionen des Promotors besonders aktiv sind, wurden verschiedene Deletionskonstrukte der Promotorregion hergestellt. Die zuvor lokalisierten potentiellen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren wurden zum Ausgangspunkt für die Lage der Deletionen. Das postulierte Promotorfragment wurde mittels PCR über die Primer TopBP intr.2 und TopBP intr.4 aus genomischer DNA aus HeLa-Zellen als Template isoliert. Das Fragment wurde über *XhoI/Sall* in das Luziferase-Reporterplasmid pGL-3basic kloniert, im Folgenden als Konstrukt D1 bezeichnet. Der Vektor pGL-3b zeichnet sich dadurch aus, dass die MCS direkt vor einem Luziferasegen für die Firefly-Luziferase liegt und es so ermöglicht, die klonierten DNA-Fragmente in einem Assay auf ihre transaktivierenden Eigenschaften zu untersuchen. Mit diesem Reporterplasmid wurden HeLa-Zellen über die Kalzium-Phosphat-Methode transient transfiziert. Die verschiedenen Deletionen wurden mittels PCR aus dem Konstrukt D1 hergestellt. Zur späteren Normalisierung der Daten des Luziferaseassays wurden die HeLa-Zellen zusätzlich mit einer konstanten Konzentration des Luziferaseplasmids *Renilla*-SV40 cotransfiziert.

Das *Renilla*-Luziferaseplasmid enthält die cDNA des Luziferasegens aus dem Anthozoen *Renilla reniformis*. Um die konstitutive Expression des Luziferasegens zu gewährleisten, ist diesem die Sequenz des starken SV40-Promotors vorgeschaltet. Als zusätzliche Kontrolle wurde separat die Transfektionseffizienz über eine Co-Transfektion der Zellen mit einem eGFP-Expressionsplasmid bestimmt. Dazu wurden den Transfektionsansätzen Deckgläschen zugefügt, auf denen die HeLa-Zellen angezogen wurden. Die Auswertung erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop. Zur Ermittlung der Basalaktivität diente eine Kontrolltransfektion mit dem Expressionsplasmid pGL-3basic ohne Promotorsequenz.

Nach der Normalisierung der Luziferaseaktivitäten zeigte sich folgendes Bild (Abb.7). Das mit 982bp größte Konstrukt D1 liefert eine starke Transkriptionsaktivierung des Luziferasegens, die auch bei den Deletionsmutanten D2-D4 erhalten bleibt. Das Deletionskonstrukt D4 entspricht hierbei der durch das Programm Gene2Promotor vorhergesagten minimalen Promotorregion. Bei den noch weiter eingekürzten Deletionskonstrukten D5 und D6 ist ein deutlicher Rückgang der Transkriptionsaktivierung zu vermerken. Bei diesen beiden Konstrukten ist nicht mehr die komplette Sequenz des vorhergesagten Promotors enthalten, was die Aussage des Minimalpromotors durch das Programm Gene2Promoter weiter stützt.

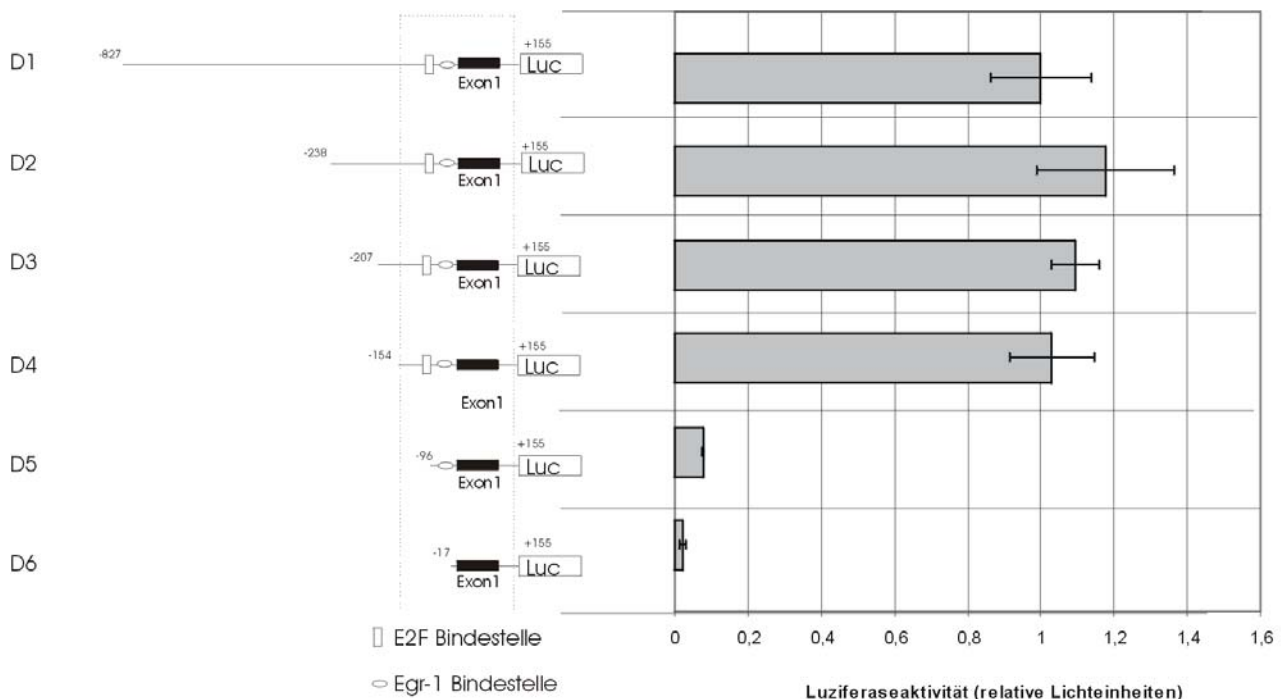


Abb. 7 Expressionsanalyse des TopBP1 Promotors

Die dargestellten Deletionskonstrukte wurden vor ein promotorloses Luziferasegen kloniert und transient in *HeLa*-Zellen transfiziert. Die im Luminometer gemessenen Luziferaseaktivitäten sind in relativen Lichteinheiten angegeben. Der relative Fehler ergibt sich aus drei unabhängig voneinander transfizierten *HeLa*-Platte, in jedem Versuch.

3.1.3. Beeinflussung des Promotors durch Transkriptionsfaktoren

Um den Einfluss der einzelnen Transkriptionsfaktoren auf den Promotor von TopBP1 zu testen, wurden verschiedene Überexpressionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Expressionsplasmide, die für den jeweiligen Transkriptionsfaktor kodieren, transient in *HeLa*-Zellen transfiziert. Die verwendeten Plasmide tragen den starken SV-40 Promotor, der eine konstitutive Expression der Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Zu Verfügung standen Expressionsplasmide für YY1, Egr-1, NFκB und E2F1. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem oben beschriebenen Luziferaseassay, der eine Co-Transfektion mit dem SV-40 *Renilla* Vektor vorsieht. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche zu gewährleisten, wurde das Konstrukt D1 gewählt, da dieses sämtliche vorhergesagte Bindestellen enthält.

Es zeigte sich, dass nur bei der Cotransfektion von Egr-1 eine signifikante Steigerung der Luziferaseaktivität zu beobachten war (Abb. 8). Das bedeutet, eine Überexpression von Egr-1 führt zu einer Stimulierung des TopBP1 Promotors.

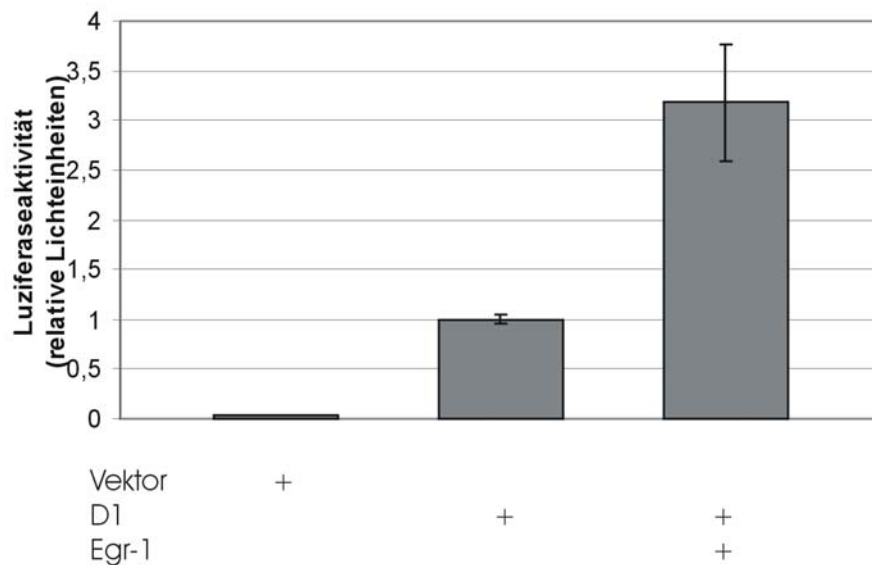


Abb. 8 Effekt einer Egr-1 Kotransfektion auf den TopBP1 Promotor

Die Daten entsprechen 3 unabhängig voneinander transfizierten HeLa-Zellkulturschalen. Die Überexpression wurde durch Kotransfektion von 3 µg Expressionsplasmid (pSG-5) zum normalen Luziferasetransfektionsansatz realisiert. Nach der Kotransfektion ist im Luziferaseassay eine Steigerung der Transkriptionsaktivierung um 200% zu beobachten.

3.1.4. Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor *in vitro*

Durch einen „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) sollte die Bindung von Egr-1 an die vorhergesagte Bindestelle im TopBP1 Promotor *in vitro* gezeigt werden. Ein Expressionsplasmid für Egr-1 wurde mit Hilfe eines Baculovirus in SF9-Insektenzellen transfiziert. Die hieraus gewonnenen Proteinlysate enthielten hohe Konzentrationen an rekombinantem Egr-1 Protein. Als Zielsequenz für das Proteinlysate wurde ein 46 bp großes Oligonukleotid gewählt, das beide Bindestellen von Egr-1 bei –53 bis –37bp und –30 bis –14 enthält (siehe Material und Methoden). Als Negativkontrolle wurde Proteinlysate verwendet, das aus Zellen stammt, die mit den Baculoviren infiziert wurden, aber kein Expressionsplasmid für das rekombinante Egr-1 Protein enthielten. Demzufolge unterscheiden sich die Lysate nur in dem enthaltenen Egr-1, da sonstige Kultivierungsschritte identisch waren. Um Verunreinigungen in der DNA auszuschließen, wurde

auch diese mit auf das Gel geladen. Mit dem Proteinlysate wurde auf die gleiche Weise verfahren. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit SYBR-Green gefärbt, um die DNA im Gel sichtbar zu machen (Abb.9.).

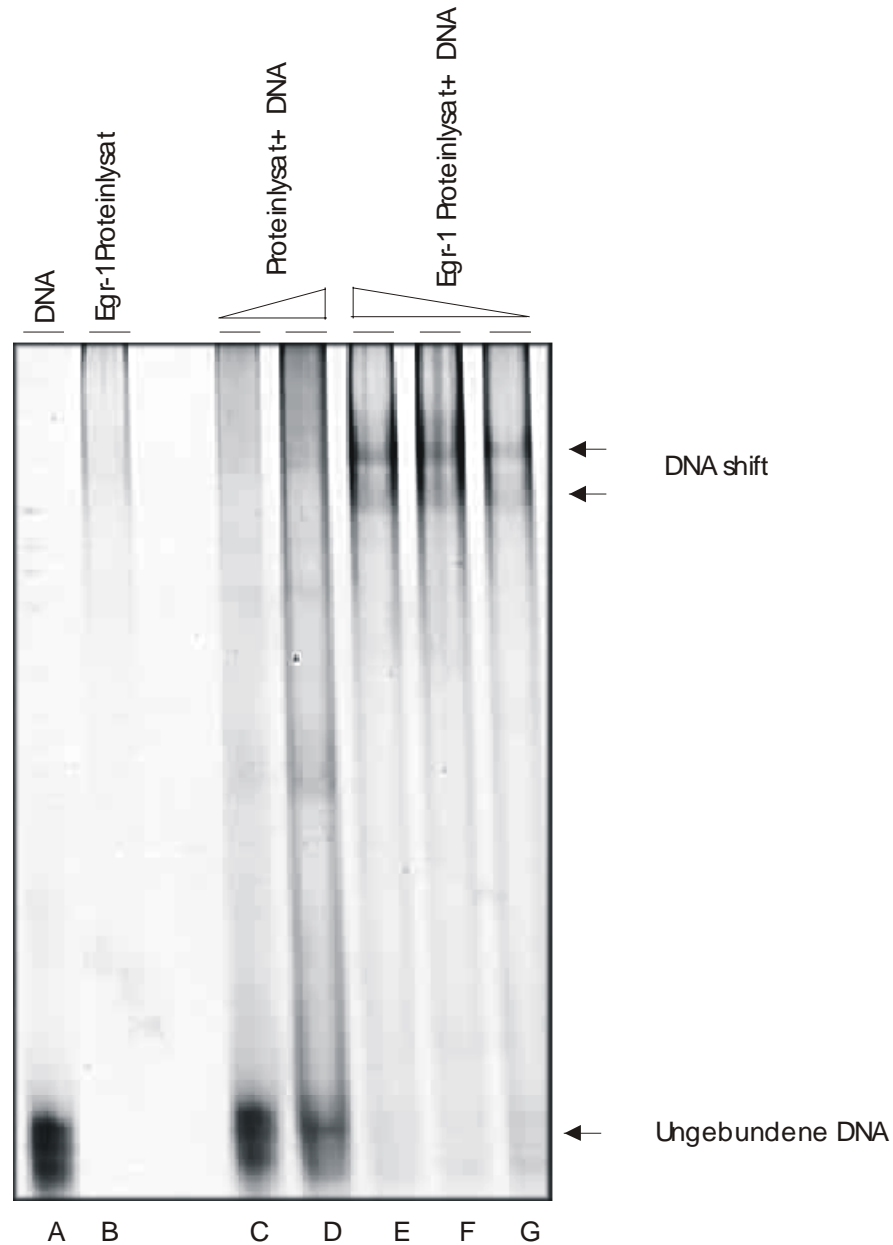


Abb. 9 Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor *in vitro*

Electrophoretic mobility shift assay von Egr-1: Bindung von Egr-1 SF-9 Zell-Lysat an ein 46bp langes Oligonukleotid, welches die Egr-1 Bindestellen des TopBP1 Promotor (-50/-18) beinhaltet.

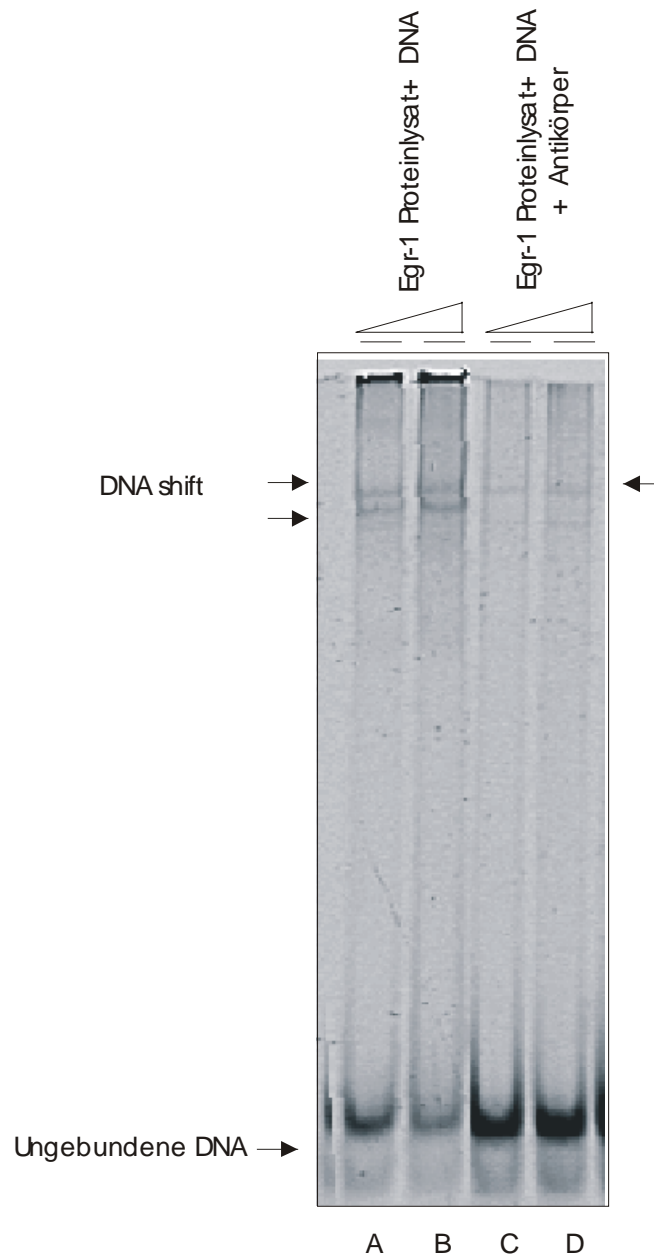
A. zeigt nur das 46 bp lange Oligonukleotid im unteren Bereich des Gels, **B.** zeigt das rekombinante Egr-1 Proteinlysate, **C** und **D** zeigten das Oligonukleotid mit steigenden Mengen an SF-9 Zellysat (C-15µg und D-25µg Protein), **E,F** und **G** zeigten das Oligonukleotid mit abnehmenden

Proteinmengen des rekombinanten Egr-1 (E-25µg, F-29µg und G-15µg Protein). Im oberen Bereich des Gels sind Banden zu erkennen, die auf ein verändertes Laufverhalten der DNA zurückzuführen sind.

In der Bahn A ist im unteren Bereich des Gels die ungebundene DNA zu erkennen. Diese ist in den Bahnen E, F und G nicht mehr zu detektieren. Hingegen erkennt man nun im oberen Bereich des Gels zwei Banden, die auf ein verändertes Laufverhalten hindeuten, das durch an die DNA gebundene Proteine verursacht wird. Mit steigender Proteinkonzentration im Reaktionsansatz wird auch die Intensität der Banden im oberen Bereich des Gels stärker. In den Reihen C und D, die anstelle des Egr-1-Proteinlysates nur das SF-9-Proteinlysat enthalten, ist auch weiterhin die ungebundene DNA im unteren Gelbereich zu erkennen, aber keine Banden im oberen Bereich. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass im Proteinlysat mit dem rekombinanten Egr-1 ein Protein spezifisch an die Ziel-DNA *in vitro* bindet.

Um die Bindung des Egr-1 Proteins an das DNA-Oligonukleotid zu beweisen, wurde ein sogenannter Supershift Versuch unternommen. Dazu wurde ein Antikörper gewählt (C-19, Santa Cruz), dessen Bindung an den Transkriptionsfaktor das Laufverhalten in der Elektrophorese weiter verändert. Der Komplex aus Transkriptionsfaktor, Oligonukleotid und gebundenem Antikörper wandert langsamer im Gel als der normale Shiftkomplex in Abb. 9. Die ursprüngliche Shiftbande sollte weiter oben im Gel wiederzufinden sein und zeigt somit den genannten Supershift. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Antikörper das Protein in der Region bindet, die für die Erkennung oder die Bindung der DNA zuständig ist. In diesem Fall wäre ein Shift durch den Transkriptionsfaktor nicht mehr möglich und die vorher sichtbare Bande müsste verschwinden.

Für diesen Versuch wurde die Menge an eingesetztem Proteinlysat auf 5 µg bzw. 10 µg verringert. Alle weiteren Bedingungen entsprachen denen des vorhergehenden Shift-Versuches. In Abb. 10 sieht man in Reihe A und B einen normalen Shift, der aus 2 Banden besteht. In Reihe C und D wurde dem Ansatz der spezifisch gegen Egr-1 gerichtete Antikörper hinzugefügt. Die untere Bande wird nach Zugabe des Antikörpers ausgelöscht. Zusätzlich erkennt man im unteren Teil des Gels, dass die Menge an ungebundener DNA zunimmt.

**Abb. 10. Egr-1 Supershift**

Reihe **A** und **B** zeigen den Shift-Versuch mit 5 μ g (**A**) bzw. 10 μ g (**B**) rekombinanten Egr-1 Proteinlysat. In Reihe **C** und **D** wurde zusätzlich noch ein Egr-1 Antikörper (Santa Cruz, C-19) zugefügt. Man erkennt im oberen Bereich des Gels, dass die untere der beiden Banden nach Zugabe des Antikörpers ausgelöscht wird.

3.1.5. Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor *in vivo*

Die gezeigte *in vitro* Interaktion zwischen Egr-1 und dem TopBP1 Promotor zeigt, dass die durch Computeranalysen vorhergesagte Bindestelle (86% Übereinstimmung der Konsensusbindesequenz) tatsächlich ein Target für den Transkriptionsfaktor ist. Ob die Affinität von Egr-1 im humanen System ausreicht, die normale Proteinkonzentration von Egr-1 in der Zelle genügt, oder die Bindestelle durch andere Faktoren besetzt ist, kann nur durch *in vivo* Versuche bewiesen werden.

Hierzu wurde die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gewählt. Es wurde mit untransfizierten HeLa-Zellen mit endogenem Egr-1 Gehalt gearbeitet. In diesem Experiment werden in den Zellen durch eine Behandlung mit 0.75% Formaldehyd im Medium die an die DNA gebundenen Proteine irreversibel an diese fixiert. Durch Ultraschall wird nach der Zellyse die DNA in kleine Stücke geschert. Das Wiederfinden einer bestimmten Sequenz beruht auf zwei Schritten, die dieser Methode die Spezifität verleihen. Der erste Schritt ist eine Immunopräzipitation. Bei der Immunopräzipitation wurde der bereits im EMSA mit Erfolg eingesetzte Antikörper (Santa Cruz, C-19) verwendet. Durch diesen wurden nur die DNA-Fragmente gebunden, die eine Zielsequenz für Egr-1 besitzen und unter normalen Bedingungen durch dieses gebunden werden. Die Antikörperkomplexe wurden an Protein A/G Sepharose immobilisiert und die DNA-Fragmente nach mehrfachen stringenten Waschschritten durch einen Proteinase K Verdau wieder in Lösung gebracht. Dem zweiten Schritt verleihen die in der PCR verwendeten Primer die Spezifität. In diesem Fall wurde die Primer so gewählt, dass sie beide Bindestellen von Egr-1 im TopBP1 Promotor (-50/-18) einschließen. Nach diesem Schritt werden alle weiteren von Egr-1 gebundenen DNA-Fragmente, außer der Zielsequenz von TopBP1, diskriminiert. Um unspezifische Bindungen von Egr-1 an einen Antikörper oder die Protein A/G Sepharose auszuschließen, wurden folgende Kontrollen in den Versuch implementiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Anti-Egr-1 Antikörpers ein gegen das Maltose-bindende-Protein gerichteter Antikörper verwendet. Als zweite Kontrolle wurde der gesamte Versuch nur mit Protein A/G Sepharose ohne Antikörper durchgeführt, um eine direkte Bindung von Egr-1 an diese auszuschließen.

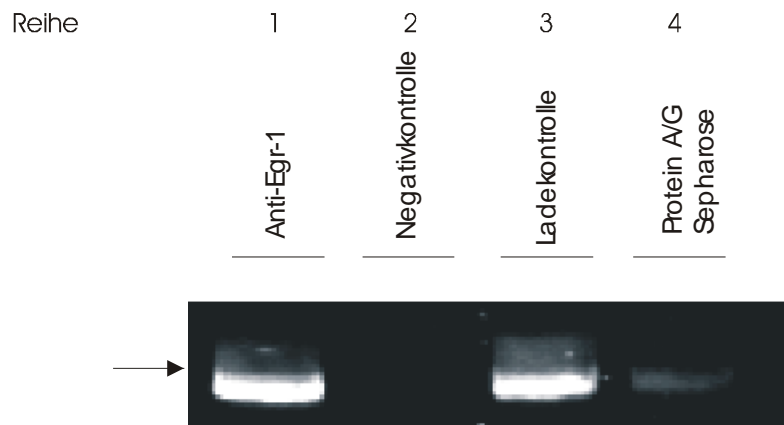


Abb. 11 Egr-1 bindet den TopBP1 Promotor *in vivo*

Für die ChIP von Egr-1 wurde ein Antikörper von Santa Cruz (c-19) verwendet (**Reihe 1**). Als Negativkontrolle wurde ein Anti-Maltose-bindendes-Protein (MBP) Antikörper verwendet (**Reihe 2**). Die immunpräzipitierte DNA durch PCR amplifiziert und im Agarosegel aufgetrennt. Als Ladekontrolle wurde unpräzipitiertes Chromatin, das im weiteren Verlauf für die spezifische Immunopräzipitation verwendet wurde, in die PCR eingesetzt (**Reihe 3**). Als weitere Kontrolle wurde der Versuch nur mit Protein A/G Sepharose durchgeführt, um unspezifische Bindung daran zu testen (**Reihe 4**).

In Reihe 1 (Abb.11) ist deutlich das erwartete PCR Produkt sichtbar, was eine Bindung von Egr-1 an die durch die Primer festgelegte Zielsequenz *in vivo* beweist. Die Negativkontrollen deuten auf keine unspezifische Bindung von Egr-1 an eine der verwendeten Komponenten hin.

3.1.6. Beeinflussung der Deletionsmutanten durch Egr-1

Die auf Grund der Luziferasedaten vermutete Bindung von Egr-1 an den Promotor von TopBP1 konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gezeigt werden. Durch eine Überexpression von Egr-1 in HeLa-Zellen ist ein deutlicher Effekt auf den TopBP1 Promotor (Konstrukt D1) und dessen Aktivität sichtbar. Egr-1 ist in der Literatur als ein schwacher Transkriptionsfaktor bekannt und kooperiert häufig mit weiteren Faktoren um seine transaktivierenden Effekte zu erzielen, wie z.B. NFAT oder NFκB (Decker *et al.*, 2003; Wieland *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck wurden die Deletionskonstrukte D2-D6 in Zellen mit überexprimiertem Egr-1 auf ihre Aktivitäten hin getestet. Das Ziel war es, durch den selektiven Wegfall einzelner Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den Deletionskonstrukten den induktiven Effekt durch Egr-1 zu minimieren oder gänzlich zu

verlieren, und somit in der 5'-Region von TopBP1 weitere regulatorische Elemente zu identifizieren.

Die HeLa-Zellen wurden zusätzlich zu dem normalen Transfektionsansatz mit den Luziferasekonstrukten mit 3 µg des Egr-1 Expressionsplasmids (pSG-5) transient transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Luziferaseaktivitäten wurden, wie oben beschrieben, gemessen und normalisiert. In diesem Versuch wurden die Luziferaseaktivitäten der Reporterkonstrukte ohne Kotransfektion mit den Aktivitäten der Versuche mit einer Kotransfektion von Egr-1 verglichen, um den induktiven Effekt zu bewerten. Des Weiteren konnten die Effekte der unterschiedlichen Deletionskonstrukte mit einer Überexpression von Egr-1 untereinander verglichen werden, um die Notwendigkeit weiterer Bindestellen zu dokumentieren.

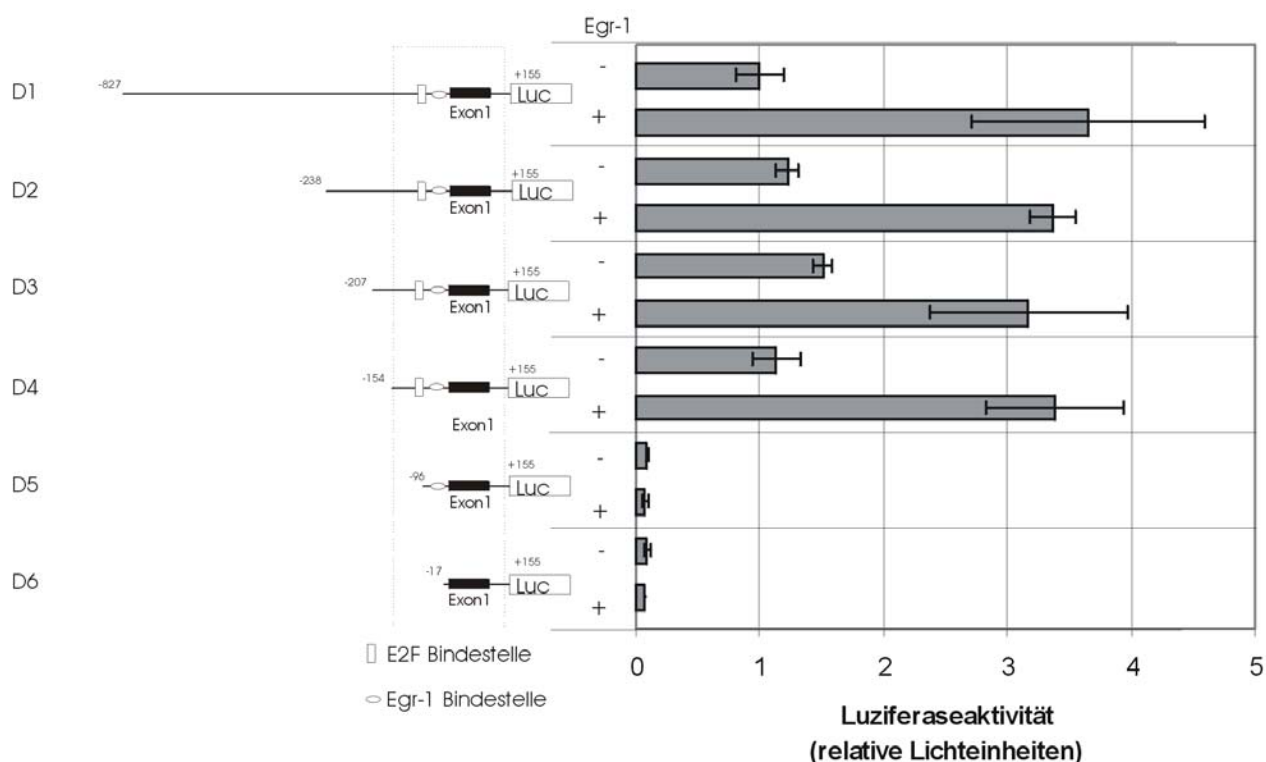


Abb. 12 Beeinflussung der Deletionskonstrukte durch Egr-1 Kotransfektion

Die dargestellten Deletionskonstrukte wurden vor ein promotorloses Luziferasegen kloniert und transient in *HeLa*-Zellen transfiziert. Die gemessenen Luziferasewerte sind in relativen Lichteinheiten dargestellt. Die Toleranz ergibt sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen. Es ist zu erkennen, dass nach der Deletion der E2F Bindestelle kein transaktivierender Effekt durch Egr-1 mehr zu verzeichnen ist, obwohl die Egr-1 Bindestellen noch intakt sind.

Die Luziferaseaktivitäten der Reporterkonstrukte D1-D4 zeigten ohne Kotransfektion von Egr-1 ähnliche Ergebnisse wie in Abb. 7 (Abb.12). Der induktive Effekt auf diese Konstrukte ist ebenfalls vergleichbar und entspricht im Fehlermittel etwa 200%, wie er auch schon bei dem Konstrukt D1 alleine gezeigt wurde. Bei den Konstrukten D5 und D6 konnte im Luziferaseassay bereits eine deutliche Verminderung der Promotoraktivität festgestellt werden und auch durch eine Überexpression von Egr-1 ist keine höhere Aktivität zu erzielen. Der induktive Effekt ist bei den Konstrukten D5-D6 nicht mehr zu beobachten.

3.1.7. Mutagenese der Egr-1 Bindesequenz im TopBP1 Promotor

Um zu testen, ob die bei –53 und –30 bp gefundenen Bindestellen für den induktiven Effekt im Falle einer Überexpression von Egr-1 in der Zelle verantwortlich sind, sollten diese Zielsequenzen mutiert werden. Des Weiteren sollte in diesem Versuch überprüft werden, inwieweit die Bindung von Egr-1 an den Promotor für dessen Basalaktivität verantwortlich ist. Es wurde die Methode der zielgerichteten Mutagenese durch PCR verwendet. In dieser Methode legen Oligonukleotide die Zielsequenz der Mutagenese fest. Die Zielsequenzen für Egr-1 im TopBP1 Promotor sollten durch eine Substitutionsmutagenese so verändert werden, dass eine Bindung des Transkriptionsfaktors nicht mehr möglich ist (siehe Abb.13). Da es sich in diesem Fall um zwei Bindestellen von Egr-1 handelt, musste die Mutagenese in zwei Schritten erfolgen. Im ersten Schritt wurde die Bindestelle bei –47 bp mutiert. In diesem Schritt diente das Konstrukt D4 als Template. Für die geplanten Luziferase-Versuche war ein Promotorfragment erforderlich, dass noch eine Induktion der Promotoraktivität durch Egr-1 zeigt, auf der anderen Seite aber möglichst wenig durch weitere Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, um den Effekt einer Mutation deutlich zu erkennen. Das erhaltene Konstrukt wurde im Anschluss in einer zweiten Mutagenese als Template für die Substitution bei –25 bp verwendet.

Egr-1 Bindesequenz

```
wt          -60 ttgctttggg gtagggggcg cgccgagtcg ggggaggggg ctgtgcgcgcg -11
Egr-1 mut-1 -60 ttgctttggg gtagtttcgg cgccgagtcg ggggatttgg ctgtgcgcgcg -11
```

Abb. 13. Region der Egr-1 Bindestelle im TopBP1 Promotor

Dargestellt ist die Sequenz des Wildtyp mit den beiden durch Boxen markierten Egr-1 Bindestellen. Unten sind die beiden Mutationen abgebildet, die jeweils eine 3-Basen-Substitution beinhalten.

Die mutierten Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen exprimiert und im Luziferaseassay ausgewertet. Zusätzlich wurde ein Egr-1 Expressionsplasmid (pSG5-Egr-1) kotransfiziert, um die Induktionsversuche durchzuführen. Jeder Luziferaseversuch wurde in 3 Kulturschalen unabhängig voneinander durchgeführt und gegen eine Kotransfektion mit der *Renilla*-Luziferase normalisiert.

Die Mutation der Egr-1 Bindestellen im Konstrukt D4 führten zu einer Transaktivierung des Promotors, die vergleichbar mit der Aktivität des unmutierten Promotors ist (siehe Abb.14). Im Falle einer Überexpression von Egr-1 in der Zelle zeigt sich bei Konstrukt D4 die bereits beobachtete Induktion der Promotoraktivität von TopBP1. Nach der Mutation von Konstrukt D4 bleibt diese Stimulierung allerdings aus.

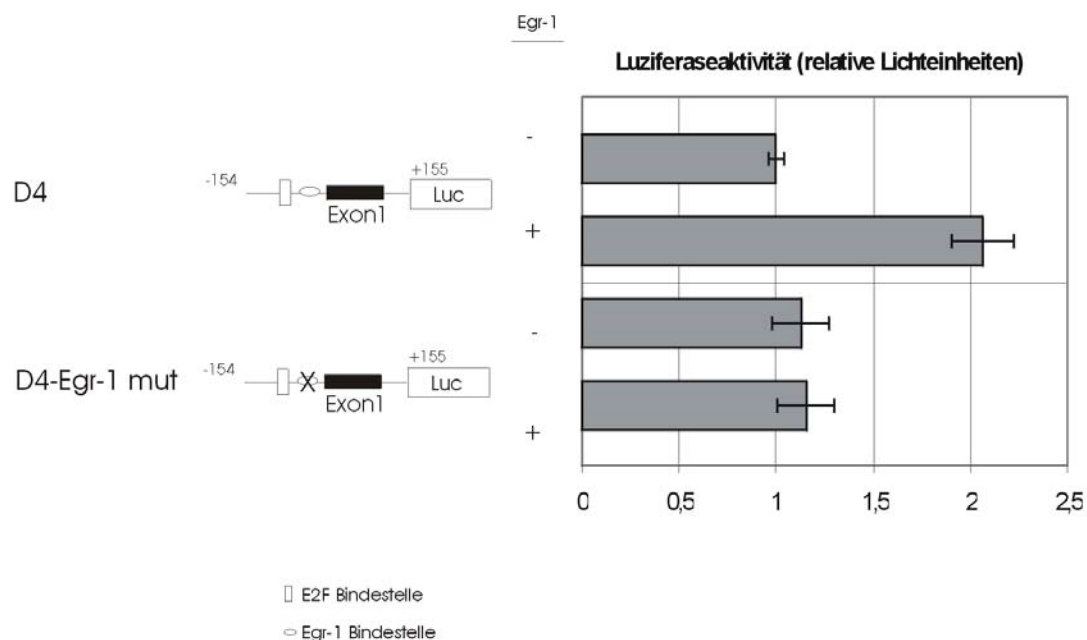


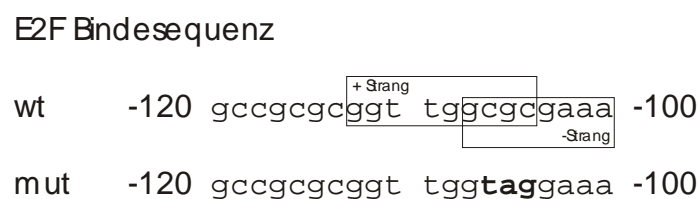
Abb. 14 Luziferaseassay der Egr-1 Mutationskonstrukte

Die linke Seite zeigt die schematische Struktur der Promotor-Luziferase Konstrukte. Zur Orientierung besonders hervorgehoben sind hierbei die Bindestellen von E2F und Egr-1. Die rechte Seite zeigt die Aktivitäten der Promotorkonstrukte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Luziferasewerte des Konstrukts D4 wurde auf den Wert 1 gesetzt und alle weiteren Aktivitäten zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

3.1.8. Mutagenese der E2F Bindesequenz im TopBP1 Promotor

Es war bekannt, dass E2F den TopBP1 Promotor in Position -110 bp bindet (Yoshida et al., 2004). In der unter 3.1.6. durchgeführten Analyse des TopBP1 Promotors durch Deletionsmutanten ist deutlich zu erkennen, dass bei Deletion der E2F Bindestelle im Konstrukt D5, die Promotoraktivierung deutlich geringer ausfällt. Zusätzlich bleibt der induktive Effekt durch Egr-1 auf den Promotor aus. Die neu gezeigte Bindung von Egr-1 an den TopBP1 Promotor und der Umstand, dass Egr-1 seine transaktivierende Wirkung oft nur in Zusammenarbeit mit weiteren Transkriptionsfaktoren entfalten kann, legen die Vermutung nahe, dass eine Kooperation mit E2F besteht.

Um weitere Hinweise auf einen kooperativen Effekt zwischen Egr-1 und E2F auf den Promotor von TopBP1 zu erhalten, wurde die Bindesequenz von E2F im Konstrukt D4 mutiert. Hierzu wurde die bereits unter 3.1.7. beschriebene Methode der zielgerichteten Mutagenese angewendet. Bei der E2F Bindestelle im TopBP1 Promotor handelt es sich bei genauerer Betrachtung um 2 Bindestellen. Die eine ist auf dem (+)-Strang und die zweite auf dem (-)-Strang angeordnet. Die Sequenzmotive der beiden Bindestellen überlappen in einem Bereich von 4 Basenpaaren. Für die Mutation wurde dieser Bereich für eine Basensubstitution von 3 Basenpaaren ausgesucht. Dadurch konnten durch eine Mutation beide Bindestellen ausgeschaltet werden (siehe Abb. 13).



Die Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in HeLa Zellen exprimiert und nach 48 Stunden geerntet. Um den Effekt einer Mutation der E2F Bindestelle auf die Bindung von Egr-1 an den Promotor besser bewerten zu können, wurde auch in diesem Versuch eine Überexpression von Egr-1 in der Zelle vorgenommen.

Im Luziferaseassay zeigt die E2F Mutante D4 eine verringerte Transkriptionsaktivierung im Vergleich zum D4 Standardkonstrukt (Abb. 17). Die Promotoraktivität ist um über 50% gesunken. Bei einer gleichzeitigen Überexpression von Egr-1 in den HeLa-Zellen ist deutlich zu erkennen, dass auch der induktive Effekt von Egr-1 um etwa 50% abgeschwächt wurde.

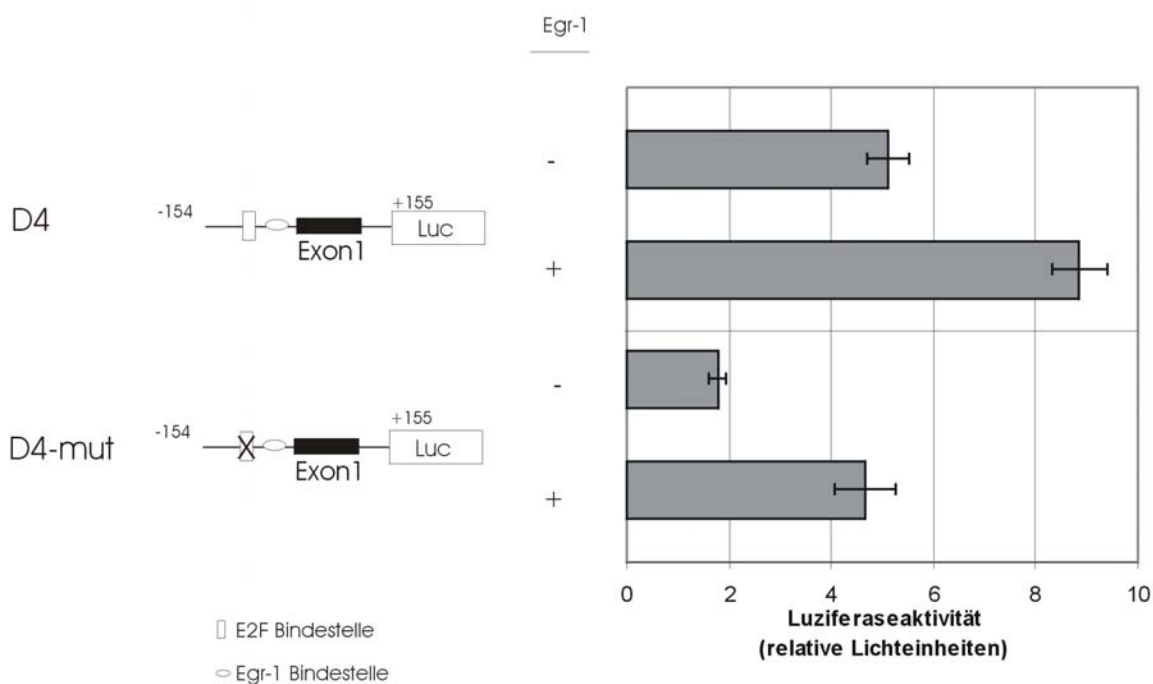


Abb. 17 Luziferaseassay der E2F-Mutationskonstrukte

Die linke Seite zeigt den schematischen Aufbau der Promotor-Luziferase Konstrukte. Die Bindestellen von Egr-1 und E2F sind hervorgehoben. Die rechte Seite zeigt die Aktivitäten der Promotorkonstrukte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.1.9. Einfluss von UV-B Strahlung auf die Expression von Egr-1 in HeLa-Zellen

Sowohl die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren, als auch die Egr Familie werden in Zusammenhang mit der Antwort einer Zelle auf UV-Strahlung gebracht. Im speziellen für TopBP1 konnte gezeigt werden, dass die Regulation nach UV über E2F Transkriptionsfaktoren erfolgt (Yoshida et al., 2004). Die E2F Familie besitzt mit E2F1 und E2F3 Aktivatoren der Transkription, die einen induktiven Effekt auf einen Promotor besitzen. Des weiteren realisieren E2F4 und E2F7 eine Repression der Promotoraktivität. Die in 3.1.4. und 3.1.5. gezeigte Interaktion von Egr-1 und dem TopBP1 Promotor verstärkt den Einfluss von UV auf den TopBP1 Promotor noch weiter. Es ist bekannt, dass die Expression des Tumorsuppressorgen Egr-1 auf der Transkriptionsebene in verschiedenen Zelllinien nach UV-B Strahlung hochreguliert ist. Aus diesem Grund wurde die für die Luziferaseassays verwendete HeLa-Zelllinie in einem Versuch auf eine mögliche Induktion der Egr-1 Konzentration durch UV-B untersucht.

HeLa-Zellen wurden in 6 cm Kulturschalen mit DMEM für 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 60 Sekunden mit UV-B Strahlung behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte in 2 Stundenschritten über einen Zeitraum von 8 Stunden. Die Zellysate wurden für den Westernblot aufbereitet und in einem 8%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Antikörper wurde der Anti-Egr-1 Antikörper von Santa Cruz (C-19) in einer Verdünnung von 1:500 in Trockenmilch verwendet. Als Ladekontrolle des Gels wurde parallel ein cdk-2 Antikörper mitgeführt. Dieser detektiert die „cyclin-dependent kinase-2“, die in den Zellen gleichstark konstitutiv exprimiert wird. Er wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 5%iger Trockenmilch eingesetzt.

In Abb. 18 ist im oberen Bereich die Antikörperreaktion von Egr-1 zu erkennen und im unteren Bereich die cdk-2 Ladekontrolle. Ohne UV ist bei 2 und 8 Stunden fast keine Bande bei Egr-1 zu erkennen. Nach einer UV-Behandlung der Zellen steigt der Egr-1 Proteingehalt in den HeLa-Zellen deutlich an. Dieser Anstieg findet sehr schnell statt. Bereits 2 Stunden nach der UV-Induktion ist die stärkste Reaktion auf Egr-1 zu erkennen. Die Proteinmenge fällt dann in den folgenden Stunden weiter ab. Dieser Versuch zeigt, dass auch in der HeLa-Zelllinie eine Induktion von Egr-1 durch UV-B Strahlung zu erreichen ist. Des Weiteren ist ein schneller Abbau der Proteinkonzentration von Egr-1 in den folgenden Stunden zu beobachten, der 8 Stunden nach der Induktion fast den normalen Stand erreicht hat.

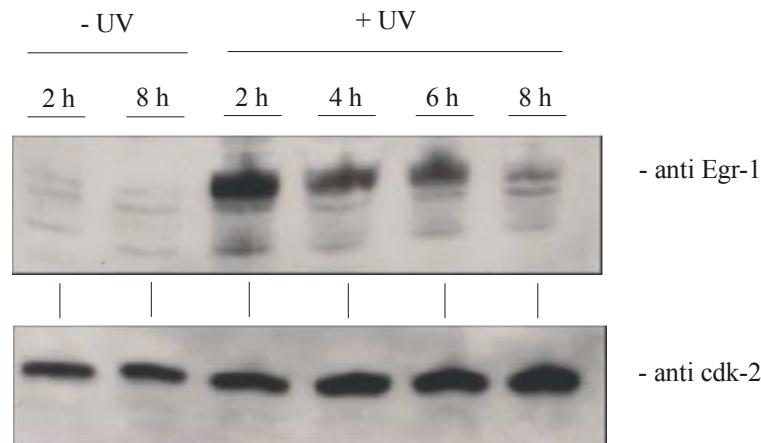


Abb. 18. Induktion von Egr-1 in HeLa-Zellen durch UV-B Strahlung

Im oberen Bereich ist die Antikörperreaktion von Egr-1 zu erkennen. Als Negativkontrolle dienen Zelllysate, die nicht mit UV-B Strahlung behandelt wurden. Sowohl die Kontrollen, als auch die UV-bestrahlten Zellen wurde nach bestimmten Zeitabschnitten geerntet. Im unteren Bereich erkennt man die mitgeführte cdk-2 Ladekontrolle. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: cdk-1 1:200; Egr-1 1:500 in Trockenmilch.

Bereits 2 Stunden nach einer UV-Induktion kann man die höchste Konzentration von Egr-1 in den Zellen beobachten. Diese Konzentration fällt in den folgenden 6 Stunden fast wieder auf die Ausgangshöhe zurück.

3.1.10. Beeinflussung des TopBP1 Promotors durch UV Strahlung

Ob die Überexpression von Egr-1 nach UV-Strahlung einen Einfluss auf den TopBP1 Promotor hat, sollte in einem Reporterassay gezeigt werden. Hierzu wurde das Konstrukt D1 verwendet, welches die Bindestellen für Egr-1 und E2F1 beinhaltet. Die Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen exprimiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen über 60 Sekunden der UV-B Strahlung ausgesetzt. Im Anschluss wurde wieder DMEM-Vollmedium auf die Zellen gegeben und diese für weitere 2-8 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und dem Luziferaseassay zugeführt.

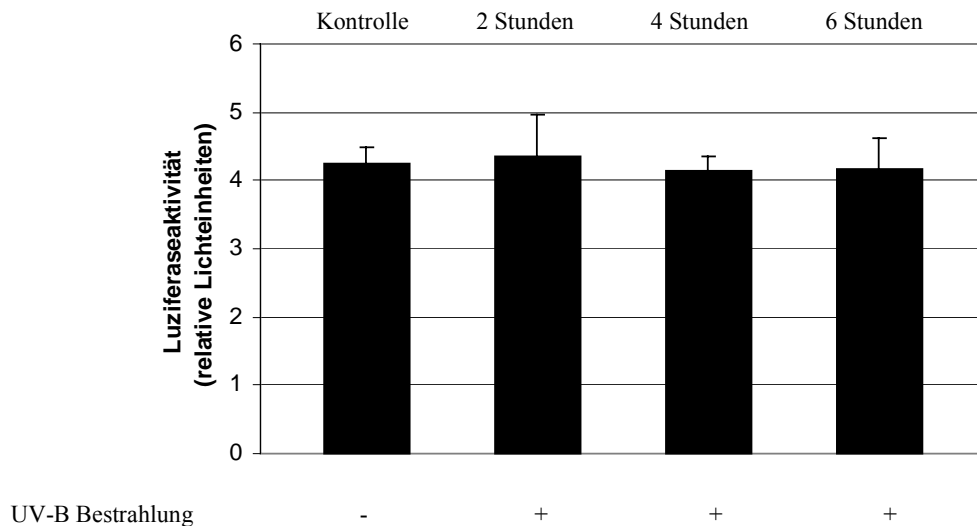


Abb. 19 Luziferaseassay nach UV-B Strahlung

Das Konstrukt D1 wurde in HeLa-Zellen transfiziert und die Kulturschalen nach 48 Stunden einer UV-B Bestrahlung ausgesetzt. Nach weiteren 2, 4 und 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Luziferaseassay analysiert. Die Kontrolle wurde keiner UV-Strahlung ausgesetzt und nach einem Mediumwechseln weitere 6 Stunden inkubiert.

Trotz der unter 3.1.9. gezeigten Induktion von Egr-1 nach UV-Bestrahlung konnte kein Effekt auf die Promotorkonstrukte von TopBP1 festgestellt werden. Die Induktion von Egr-1 durch UV-Strahlung liefert also nicht denselben Effekt wie eine Überexpression durch Cotransfektion mit einem Expressionsvektor. Diese Beobachtung lässt auf andere Mechanismen schließen, die im Falle einer UV-Schädigung die Induktion von TopBP1 durch Egr-1 verhindern.

3.2. Untersuchung der Funktion von TopBP1 in der Zelle

Neben den Promotoruntersuchungen sollte auch die Funktion von TopBP1 als Protein in dieser Arbeit weiter untersucht werden. TopBP1 interagiert mit einer Reihe von Proteinen, die an unterschiedlichen Funktionen in der Zelle beteiligt sind. Diese Vielfalt an möglichen Funktionen und Aufgaben macht es erforderlich, Methoden zu verwenden, die gleichzeitig mehrere Gene bzw. Proteine parallel beobachten können. Eine Methode hierfür ist die Microarray-Technik, die gleichzeitig die Genexpression von mehreren Genen dokumentieren kann (Promotion von Yvonne Wollman, HKI-Jena 2005). Auf Proteinebene steht die Methode der zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese zur Verfügung, die das gesamte Proteom einer Zelle darstellen kann. Mit dieser Methode sollten Einflüsse auf die Expression anderer Proteine im Falle einer Suppression von TopBP1 durch RNAi untersucht werden.

Der Begriff RNA-Interferenz wurde erstmals von Fire und Mello gebraucht und beschreibt die Suppression spezifischer Gene ausgelöst durch doppelsträngige RNA (dsRNA). Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze dieser Technologie für die Suppression von TopBP1 verwendet. Der erste basiert auf einem Vektor, der in den transformierten Zellen eine kontinuierliche Synthese von siRNA (small interfering **RNA**) ermöglicht. Bei der zweiten Methode werden die 21 Nukleotide lange doppelsträngigen siRNAs durch transiente Transfektion direkt in die Zellen gebracht.

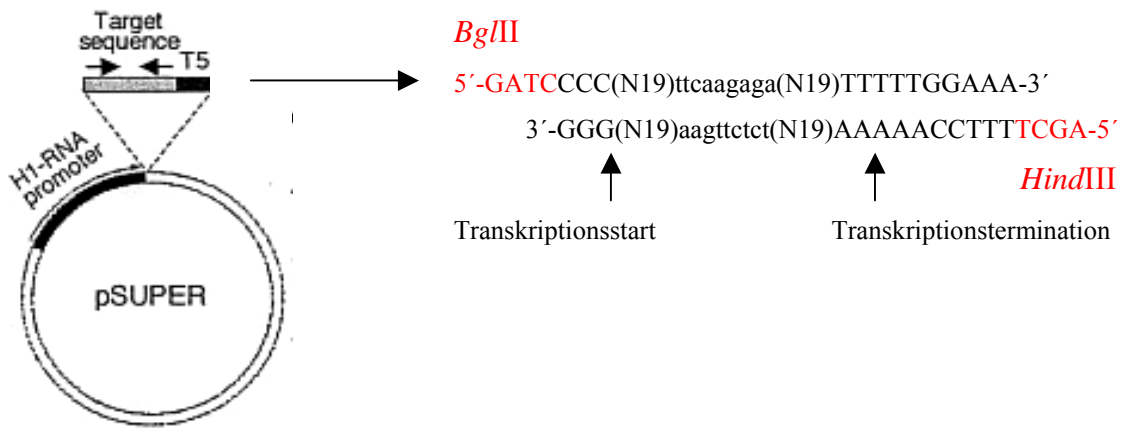
3.2.1. Suppression von TopBP1 durch pSUPER

Das pSUPER Vektorsystem ermöglicht die Synthese von kurzen interferierenden RNAs in Säugerzellen. Es wurde von Thijn R. Brummelkamp (Brummelkamp *et al.*, 2002) etabliert und freundlicherweise von Rene Bernards (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pSUPER basiert auf dem Vektor pBluescript II KS+ (Stratagene) und wurde durch die Insertion des PolymeraseIII H1-RNA-Promotors mit *Bgl*II-Restriktionstelle modifiziert (Abb.20). Der Promotor besitzt einen definierten Transkriptionsstart und ein Terminationssignal, das aus fünf aufeinander folgenden Thymidinen besteht (Bear *et al.*, 1990). Das produzierte Transkript wird nach dem zweiten Uridin gespalten, was zu zwei 3'überhängenden T bzw. U Nukleotiden führt. Die RNA-Transkripte, die hierdurch entstehen, enthalten keinen Poly-A-Schwanz.

Das für TopBP1 spezifische Insert besteht aus zwei 64bp langen Oligonukleotiden. Diese bestehen aus einer 19 bp Nukleotid-Sequenz aus dem 5'-Bereich der TopBP1-cDNA, die durch 9 Spacernukleotide von der revers komplementären 19er Nukleotid-Sequenz getrennt ist. Auf der einen Seite wird dieses Oligonukleotid von dem Transkriptionsstart und auf der anderen Seite vom Terminationloкус flankiert. Für die Klonierung des Inserts in den Vektor ist 5' ein *Bgl*II- und 3' ein *Hind*III-Lokus angefügt worden. Das transkribierte RNA-Oligonukleotid faltet sich durch die palindromischen Sequenzen spontan zu einer sogenannten Haarnadelschleife (stem-loop, Abb. 20 B). Diese Struktur wird von DICER Enzymen erkannt und gespalten. Das komplette Konstrukt wurde von Michael Wanzel (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt.

A.

spezifisches TopBP1 Insert



B.

Gegen TopBP1 gerichtetes Transkript

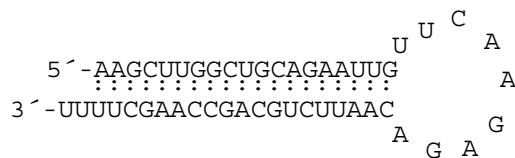


Abb.20 Darstellung der Vektor-basierenden Gensuppression bei TopBP1

- A. Schematische Darstellung des pSUPER Vektors, ein Derivat des pBluescript II KS+ (Stratagene). Direkt vor die Insertionsstelle der Zielsequenz wurde der Polymerase III H1-RNA Promotor kloniert. Als Insert fungiert die 19 Nukleotide lange TopBP1-Zielsequenz (cDNA), gefolgt von einem kurzen *Spacer* und einer zur Zielsequenz revers komplementären Sequenz. Das Insert besitzt eine Gesamtlänge von 64 Nukleotiden. Direkt vor der Zielsequenz bzw. dahinter, befindet sich der Transkriptionsstartpunkt und die Terminationssequenz. Des weiteren sind die für die Klonierung wichtigen Schnittstellen *Bgl*III und *Hind* III enthalten
- B. Das hier gezeigte Produkt der Transkription bildet eine Haarnadelstruktur aus, die im sogenannten Stamm die TopBP1 Zielsequenz enthält, die von dem *Spacer* in der Schleife getrennt wird.

Die Konstrukte wurden durch transiente Transfektion mit der Kalziumphosphatpräzipitations-Methode in HeLa Zellen zur Expression gebracht. Für die anschließende Selektion, in der nicht transfizierte Zellen von Zellen, die den pSUPER Vektor enthalten diskriminiert werden, wurde ein zweites Plasmid mit einer Antibiotika-Resistenzdeterminante, in diesem Fall Puromycin, cotransfiziert. Um eine homogen transformierte Zellpopulation zu erhalten, wurden die HeLa-Zellen 5 Tage unter Puromycinselektion kultiviert. Als interne Kontrolle dienten Zellen, die mit einem pSUPER-Vektor transfiziert wurden, der kein TopBP1 spezifisches Insert enthielt. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet und aufgeschossen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt und gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Polyakrylamidgel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben erfolgte die Analyse des TopBP1 Proteingehalts im Westernblot. Für die Detektion wurde ein polyklonaler Antikörper von Novus Biologicals in einer Verdünnung von 1:10000 in Trockenmilch verwendet. Als Auftragekontrolle für gleiche Gesamtproteinmengen diente die Zyklin-abhängige Kinase 2 (Cdk2), deren Proteinkonzentration in allen Proben etwa konstant ist.

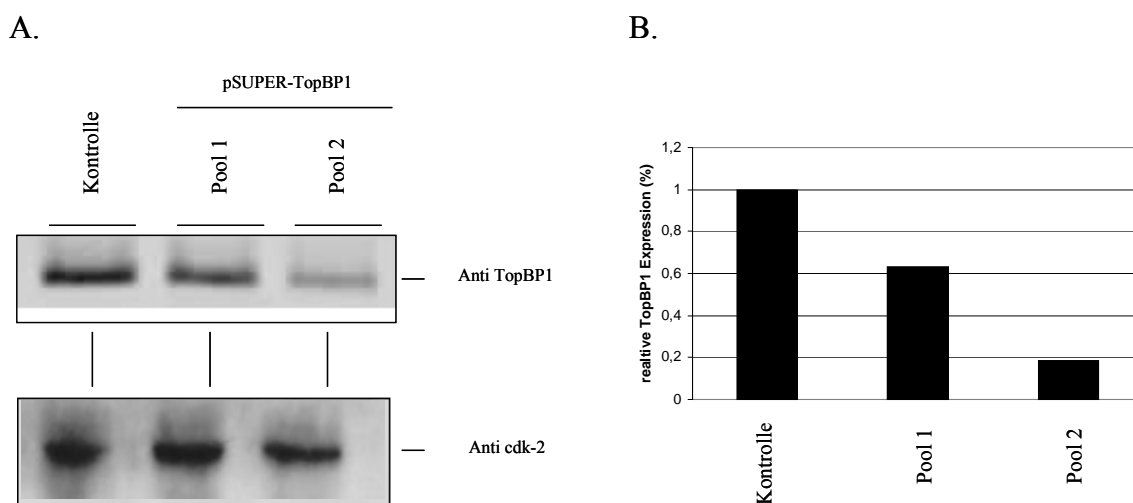


Abb. 21 pSUPER induzierter knock-down von TopBP1 in HeLa-Zellen

- A. In der ersten Bahn ist die Kontrolle von HeLa-Zell-Lysat aufgetragen, die mit pSUPER-Vektor ohne Insert transfiziert wurde und dementsprechend eine normale TopBP1 Expression zeigt. In den mit 1-3 gekennzeichneten Bahnen sind unabhängig von einander gewonnene HeLa-Zellysate auf den TopBP1 Gehalt getestet worden, und es ist eine deutliche Verringerung der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Im unteren Teil ist die cdk-2 Ladekontrolle zu erkennen, die den Proben einen vergleichbaren Gesamtproteingehalt zuweist.

- B.** Die densitometrische Auswertung des Films ergab eine 80-90%ige Reduktion der TopBP1-Expression bei den pSUPER behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

In Abb. 21 ist ein Westernblot abgebildet, der bei den Proben 1-3 eine deutliche Verringerung des TopBP1 Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle, ohne ein gegen TopBP1 gerichtetes Insert, aufweist. Der aus dem Immunoblot erhaltene Film wurde eingescannt und densitometrisch ausgewertet (Abb. 21 B). Die Auswertung ergab eine Abregulierung des TopBP1 Proteingehaltes von 80 Prozent verglichen mit den Kontrollzellen. Die Expression der zum Vergleich mitgeführten Zyklin-abhängigen-kinase 2 wurde durch die pSUPER Behandlung nicht beeinflusst.

3.2.2. Suppression von TopBP1 durch siRNA

Als ein möglicher Nachteil für weitere Versuche muss die lange Selektionszeit unter Puromycin betrachtet werden. Es ist für weiterführende Versuche, im Hinblick auf Apoptose und veränderte Genexpression unklar, welchen Einfluss ein derartiger Selektionsdruck auf die Zellen ausübt. Deshalb wurde ein weiterer Ansatz für eine Verminderung der TopBP1 Expression in humanen Zellen angewandt, bei dem die siRNAs durch transiente Transfektion direkt in die Zellen eingebracht werden. Im Gegensatz zu der auf pSUPER basierenden Methode werden die siRNAs nicht erst in den Zellen produziert, sondern zuvor synthetisch hergestellt und die 21 Nukleotide langen doppelsträngigen siRNAs durch Lipofektion (RNAi-Fect, QIAGEN) in die Zellen transfiziert. Die Ermittlung der optimalen Sequenzen der siRNAs wurde durch speziell für humane Systeme entwickelte Algorithmen von der Firma QIAGEN durchgeführt. Des Weiteren sollten Homologien zu Sequenzen anderer Gene möglichst vermieden werden damit sogenannte „off-target“ Effekte ausbleiben. Die 4 bereitgestellten siRNAs mussten anschließend in der Zellkultur auf ihre Wirksamkeit hin getestet werden. Für die Transfektion in HeLa Zellen wurde das für die siRNAs optimierte Transfektionsagens RNAi-Fect (QIAGEN) verwendet. Der Vorteil dieser Methode beruht auf einer sehr hohen Transfektionseffizienz, die im Gegensatz zu der Kalziumphosphatpräzipitationsmethode über 90% der Zellen einschließt. Bei einem so hohen Prozentsatz transfizierter Zellen, kann auf eine anschließende Selektion verzichtet werden, und somit Stresssituationen, die Ergebnisse verfälschen können, weiter minimiert werden. Die Transfektionseffizienz wurde durch GFP-markierte Kontroll-siRNA in der Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

```

1      cgaccccagc caccgccttg cggccagcgc gtcccccgcg tcgcccgcgc gagaccccga
61     ggctccaacg agttcagaaa tgtccagaaa tgacaaagaa ccgttttttg tgaagttttt
121    aaaagtcttca gacaattcca aatgtttttt taaagctctc gagtccataa aagaattcca
181    atcagaagaa tatcttcaga ttattacaga agaagaggca ttgaagataa aggagaaatga
241    tagatcactt tatactctgcg acccttttag tggcgttgct tttgatcacc tcaaaaagct pSUPER
301    tggctgcaga attgttggc ctcaagtagt catattttgt atgcaccacc agcgatgtgt
361    cccaagagcc gaacatccag tttataatat gggtatgtct gatgtaacca tatcttgtac
421    aagtctggaa aaagaaaaaa gggaagaagt tcataaatat gtacaaatga tgggcggacg
481    agtatacaga gaccttaatg tatcagtaac tcaccttatt gcaggagaag ttggtagcaa
541    aaaatattta gttgctgcaa acctgaagaa acctattttg cttccctctt ggataaaaac
601    actttgggag aagtcacaag agaaaaaaat aactagatat actgatataa acatggaaga
661    tttcaagtgt cctatttttc ttggttgcat aatctgtgtg actggcttat gtggcttaga
721    caggaaagaa gttcagcaac tcacagttaa gcatggaggt caatacatgg gacaattgaa
781    aatgaatgaa tgtacacacc tcattgtgca agaaccaaaa ggtcagaagt atgagtgtgc
841    caagagatgg aatgtacact gtgtgaccac acagtggttt tttgacagta ttgagaaagg
901    tttttgtcag gatgaatcca tatacaagaa agaacttaga ccagaagcaa agactatgcc siTop3
961    caattcttca actcctacca gccagatcaa cacaattgat agtcgtactc tttcagatgt
1021   cagcaatatt tccaacataa atgcaagttg cgtaagtga tcaatatgta attcacttaa
1081   cagcaaaactg gaggctacac ttgaaaatct agaaaa tctg gatgtcagtg catttcaagc siTop4
1141   acctgaagat ttatttagatg gttgtcggat atatctttgc gggttttagtg gcagaaagct
1201   agataaaactg agaagactta ttaacagtgg aggtggagtt cgttttaacc agctaaatga
1261   agatgtaact catgttattg tgggagatta tgatgatgaa ttgaagcagt tttggaataa
1321   atcagcccac aggcctcatg tagtgggagc aaagtggttg ctagagtgtt tcagtaaagg
1381   ttatatgctt tctgaagaac catatatcca tgctaattac cagccagtgg aaattccagt
1441   ttcacatcag cctgaaagta aagcagctct tttaaaaaag aagaacagca gcttctctaa
1501   gaaagacttt gctcctagtg aaaagcatga gcaagctgat gaagatctgc tctctcaata
1561   tgaaaatggt agtccacag tagttgaggc taagacgtct gaagccaggc cctttaatga
1621   ttctactcat gctgagccct tgaatgattc tactcacatt tctttgcaag aagaaaacca
1681   gtcttctgtc agtcattgtg tccctgatgt ttctacaatt actgaagaag gcttatttag
1741   ccaaaagagt ttccttgttt tgggttttag taatgaaaat gaatctaaca tcgcaaacat
1801   cataaaagaa aatgctggga aaatcatgtc ccttctgagc agaactgttg cggattatgc
1861   tgtggttcct ctgctggggt gtgaagtgga agccactgtg ggagaagttg ttacaaatac
1921   atggctggtt acttgcatag actatcagac tttgtttgat ccaaagtcga atcctctctt
1981   cacaccagtt ccagtaatga caggaatgac tccttttagag gatttgtgta tttcatttag
2041   ccagtgtgct ggagcagaaa aagagtcctt aacattccta gcaaacctcc ttggagcaag
2101   tgttcaagaa tactttgttc gcaaatccaa tgcaaagaaa ggcattgttg ccagtactca
2161   tcttatactg aaa gaacgtg gtggctctaa atatgaagct gcaaagaagt ggaatttacc siTop1/2
2221   tgccgttact atagcttggc tgttggagac tgctagaacg ggaaagagag cagacgaaag
2281   ----5255bp

```

Abb. 22 Lage der siRNA in der TopBP1 mRNA-Sequenz

Die siRNA Sequenzen sind in gelb hervorgehoben. Ebenfalls eingezeichnet ist die Insertzielsequenz des pSUPER Vektors.

In Abb. 22 ist die Lage der 4 siRNA- Oligonukleotide und der mRNA von TopBP1 dargestellt. Ebenfalls eingezeichnet ist die Insertzielsequenz des oben verwendeten pSUPER Vektors. Die erste Aufgabe bestand darin, die siRNA mit dem stärksten Effekt auf die mRNA von TopBP1 zu ermitteln. 48 Stunden nach der Transfektion mit den siRNA wurden die HeLa-Zellen geerntet und die mRNA präpariert. Die mRNA wurde durch einen Oligo-dT(15)-Primer in einer reversen

Transkription unter Verwendung der PowerScript Reversen Transkriptase (Clontech) in Einzelstrang-cDNA umgewandelt. Im Anschluss erfolgte in einer sogenannten RealTime-PCR die Bestimmung der im Gesamtansatz enthaltenen mRNA von TopBP1. In dieser PCR-Technik wird durch die fortschreitenden Zyklen hinweg eine Messung des DNA-Gehaltes im Ansatz durchgeführt. In diesem Fall wurde dies durch Zugabe von SYBR-Green realisiert, dessen Fluoreszenz nach Interkalation in die DNA messbar ist. Aus dem Anstieg des Kurvenverlaufs und dem Eintritt in die stationäre Phase lässt sich die Ausgangskonzentration des eingesetzten Templates bestimmen. In der Grafik 18 B ist der relative pull-down der Konzentration der TopBP1 mRNA in den HeLa-Zellen zu erkennen. Die vierte siRNA liefert hierbei den größten Effekt und wird für die weiteren Suppressionsversuche verwendet.

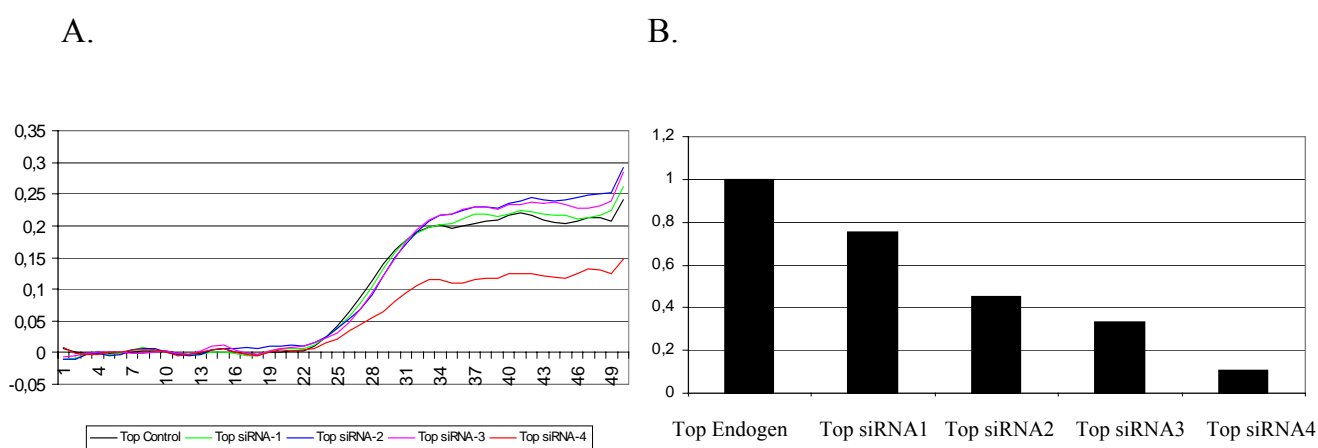


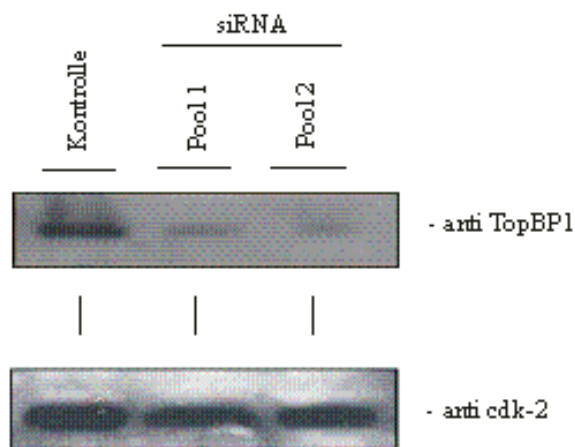
Abb 23. pull-down der TopBP1 mRNA

- A.** Die Amplifikationskurve zeigt den Verlauf der Amplifikation über die Zyklen hinweg an. Hieraus ist ersichtlich, wann eine Amplifikation in die stationäre Phase eintritt.
- B.** Aus der Amplifikationskurve der Proben im Vergleich zu der Kontrolle lassen sich die Ausgangskonzentrationen der TopBP1 mRNA berechnen und die Effekte der einzelnen siRNAs vergleichen. Aus dem Balkendiagramm ist ersichtlich, dass siRNA4 die besten Resultate erzielt.

Um den Einfluss eines TopBP1 pull-down durch siRNA auf das Proteom einer Zelle zu untersuchen, muss zuvor sichergestellt werden, dass nicht nur die mRNA-Konzentration geringer ist, sondern auch die Proteinkonzentration von TopBP1 abnimmt. Zu diesem Zweck wurden Westernblotexperimente durchgeführt. HeLa-Zellen wurden wie bereits beschrieben mit siRNA transient transfiziert und nach 48h geerntet. Die Proteinlysate wurden aufgearbeitet und im 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für den Immunoblot wurden die unter 3.2.1 beschriebenen

Antikörper in den gleichen Verdünnungen verwendet. Der dargestellte Westernblot (Abb. 24) zeigt 2 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit siRNA-4. Im Vergleich zur Kontrolle ist eine deutliche Abschwächung der Banden zu erkennen. Die durchgeführte densitometrische Untersuchung des Films ergab einen Rückgang der Immunreaktion um 70-90%.

A.



B.

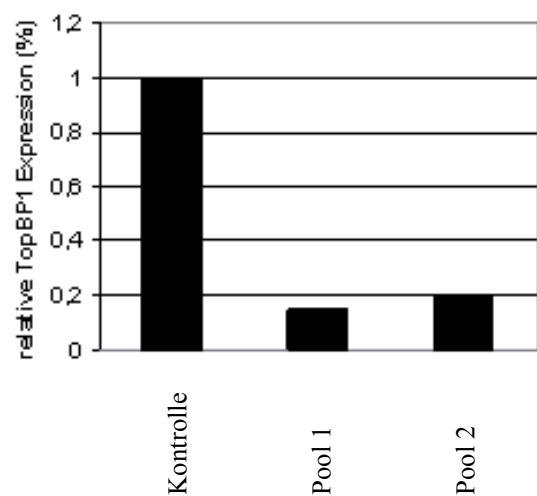


Abb. 24 siRNA induzierter Knock-down von TopBP1 in HeLa Zellen

- A.** In der ersten Bahn ist die Kontrolle aufgetragen, in der HeLa-Zellen nur mit Transfektionsagens ohne siRNAs behandelt wurden. In der zweiten und dritten Bahn sind 2 voneinander unabhängig durchgeführte siRNA Versuche zu sehen, die einen eindeutigen Silencing-Effekt zeigen. Im unteren Bereich des Films ist die interne cdk-2 Ladekontrolle zu erkennen, die den Proben einen vergleichbaren Gesamtproteingehalt zuweist.
- B.** Eine densitometrische Auswertung des Films ergab auch auf der Proteinebene eine Reduktion von TopBP1 um 80-90% im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.3. Einfluß des TopBP1-knock-downs auf das Wachstum von HeLa-Zellen

Um den Effekt des TopBP1 knock-downs auf den Phänotyp der Zellen zu untersuchen, wurden Zellwachstumsversuche unternommen, in denen normale und Zellen mit reduzierter TopBP1 Expression einer DNA-Schädigung durch UV-B Strahlung ausgesetzt wurden. Hierzu wurden HeLa Zellen in geringer Dichte ausgesät und nach dem oben beschriebenen Protokoll mit siRNA

behandelt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit UVB (500 J/m^2) bestrahlt. Die Wachstumsversuche wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet und die Zellen angefärbt. In Abb. 25 sind die blau angefärbten überlebenden Kolonien zu erkennen.

Während die Kontrollzellen in der Lage waren, normal zu proliferieren, zeigten die TopBP1 knock-down Zellen leicht verminderte Koloniebildung. Die Effekte der geringeren Zellviabilität nehmen mit der Zeit zu, so dass 72 Stunden nach der siRNA Transfektion die geringere Zelldichte deutlich zu erkennen ist. Die bestrahlten Zellen, in denen mittels siRNA die TopBP1 Expression verringert wurde, zeigen noch geringere Überlebensraten. Bereits 72 Stunden nach der Behandlung sind über 90% der Zellen abgestorben.

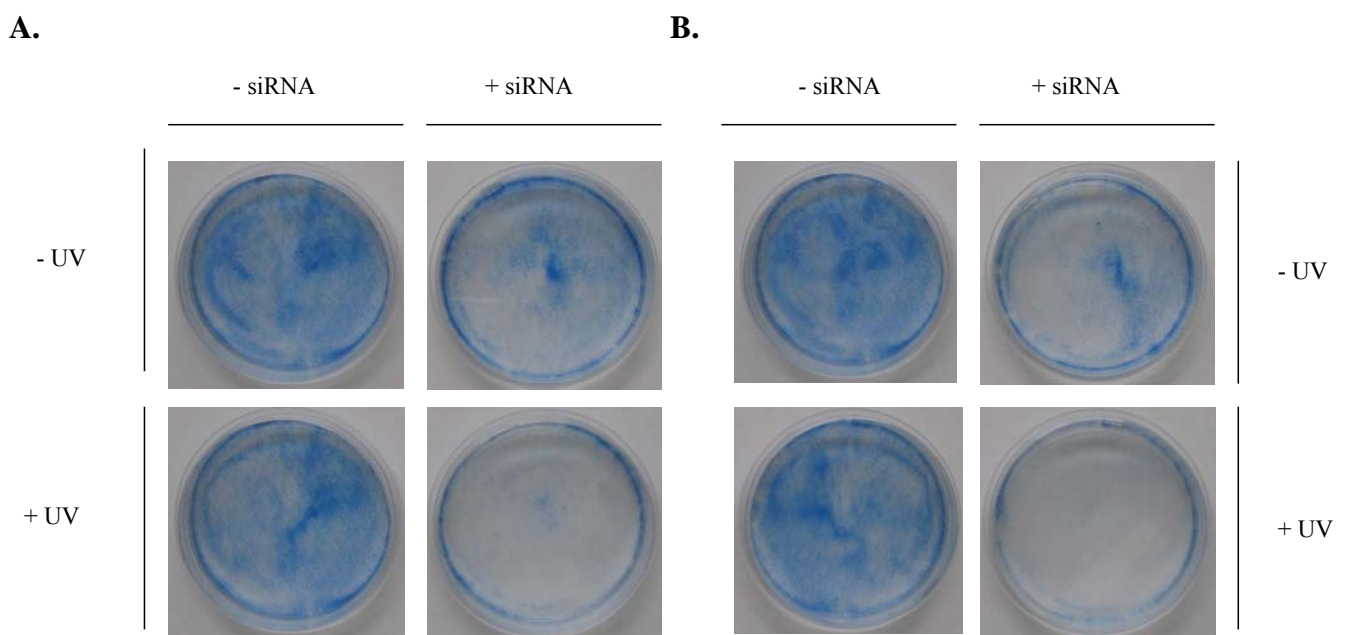


Abb. 25 Wachstumsversuche mit HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit siRNA-3 transfiziert. Ein Teil HeLa-Zellen wurde UV-B (500 J/m^2) bestrahlt. Die ausgewachsenen Kolonien wurden nach 48 Stunden (**A.**) und 72 Stunden (**B.**) fixiert und angefärbt. Die Proliferation der mit siRNA behandelten Zellen wird nach DNA-Schädigung durch UV-B Strahlung stark inhibiert verglichen mit Kontrollzellen.

3.3. Etablierung der experimentellen Voraussetzung für eine Proteomanalyse von HeLa Zellen nach TopBP1 knock-down

Die Proteinstruktur von TopBP1 ist durch seine acht BRCT Domänen gekennzeichnet, durch die eine Vielzahl von Protein-Protein Interaktionen realisiert werden. Durch seine Interaktionspartner wie z.B. DNA Polymerase ϵ (Mäkinen *et al.*, 2001), wird TopBP1 mit der DNA Replikation in Verbindung gebracht. Anhand isolierter HeLa-Kerne wurde gezeigt, dass die replikative DNA-Synthese durch ein gegen TopBP1 gerichtetes Antiserum vergleichbar effizient gehemmt werden kann, wie mittels neutralisierender Antikörper gegen die DNA Polymerasen α und ϵ (Mäkinen *et al.*, 2001, Pospiech *et al.*, 1999). Weitere Interaktionspartner bringen TopBP1 in Verbindung mit Proteinen, die im Falle einer DNA Schädigung eine Rolle spielen (BRCA1, 53BP1). Im vorhergehenden Versuch konnte eine geringere Zellviabilität durch einen TopBP1 knock-down in HeLa Zellen gezeigt werden. Dieser Effekt lässt auf eine ganze Reihe von Proteinen schließen, die durch TopBP1 beeinflusst werden. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Methode 2D-PAGE, O'Farrell, 1975) lassen sich nach einem erfolgreichen knock-down die Effekte auf das Proteom untersuchen.

3.3.1. Identifizierung von TopBP1 im HeLa-Proteom

Als Voraussetzung für eine Proteomanalyse nach einem Knock-down mussten die TopBP1 Proteinspots im 2D-Gel identifiziert werden. Ein zuvor im Westernblot auf einen erfolgreichen TopBP1 knock-down hin geprüftes HeLa-Zelllysate wurde zur Isoelektrofokussierung (1. Dimension) auf einen IPG-Strip geladen und elektrophoretisch getrennt. Die fokussierten Streifen wurden im Anschluss auf ein SDS-Gel aufgebracht und wieder elektrophoretisch getrennt (2. Dimension). Zusätzlich wurde ein mit Proteingrößenmarker getränktes Stück Filterpapier auf einer Seite des Gels aufgelegt und zusammen mit dem IPG-Strip mit Agarose überschichtet. Zur Visualisierung der Proteinspots wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen.

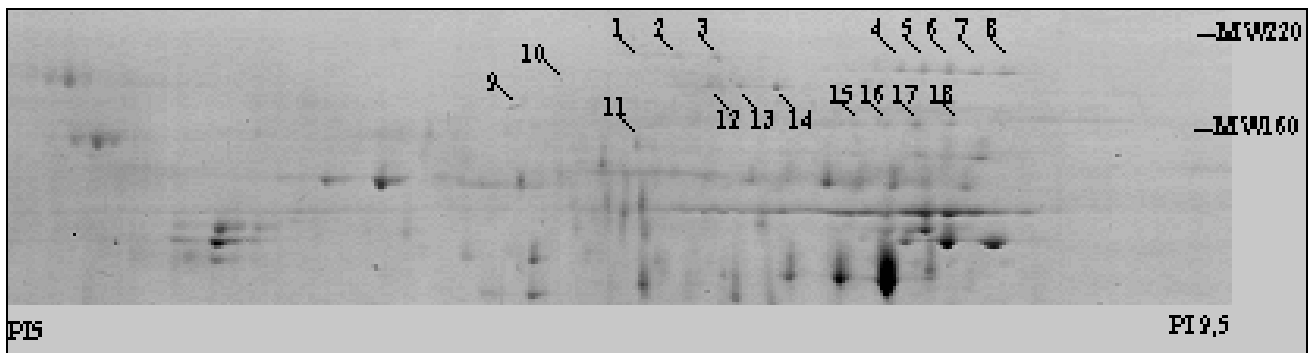
TopBP1 besitzt ein Proteingewicht von ~180 kDa und einen in der Literatur bekannten pI von 8.5. Anhand dieser Daten konnte die in Frage kommende Region, in der die TopBP1 Spots erwartet wurden, eingegrenzt werden. Zunächst wurde die gesamte obere Region des Gels zwischen 220 kDa und 120 kDa abgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es musste sichergestellt werden, dass sich durch eine Antikörperdetektion TopBP1 in dem 2-D-Gel wiederfinden lässt (Abb.26). Hierdurch lässt sich die Region, in der die TopBP1 Spots liegen, weiter eingrenzen. Auf dem Film sind insgesamt 6 Spots zu erkennen, die in einer Reihe angeordnet sind. Sie entsprechen

TopBP1 und seinen Abbauprodukten, die weiterhin durch den verwendeten Antikörper detektiert werden.

In einem weiteren Versuch sollten die im Blot gefundenen Signale den im gefärbten Gel erkennbaren Spots zugeordnet werden. Zu diesem Zweck wurden in Frage kommende Proteinspots aus dem Gel ausgestochen (Abb. 26 A) und einem sogenannten Dot-Blot unterzogen. Die gestochenen Gelfragmente wurden entfärbt und die Proteine aus ihnen herausgelöst. Anschließend wurden die in Lösung befindlichen Proteine direkt auf die PVDF-Membran aufgetragen (sogenannte Dots). Als Positivkontrolle für die nun folgende Antikörperdetektion diente rekombinantes TopBP1 Protein, das die 6-8 BRCT Domäne einschließt (pSH29).

Auf dem entwickelten Film (Abb. 26 B) ist deutlich die Positivkontrolle in der linken oberen Ecke zu erkennen. Zusätzlich geben die Spots 1-3 in der Reihe 2 ein positives Signal auf den TopBP1 Antikörper. Die schwache Intensität des Signals ist auf geringe Proteinkonzentration in den eluierten Spots zurückzuführen.

A.



B.



Abb. 26 TopBP1 im 2D-Gel

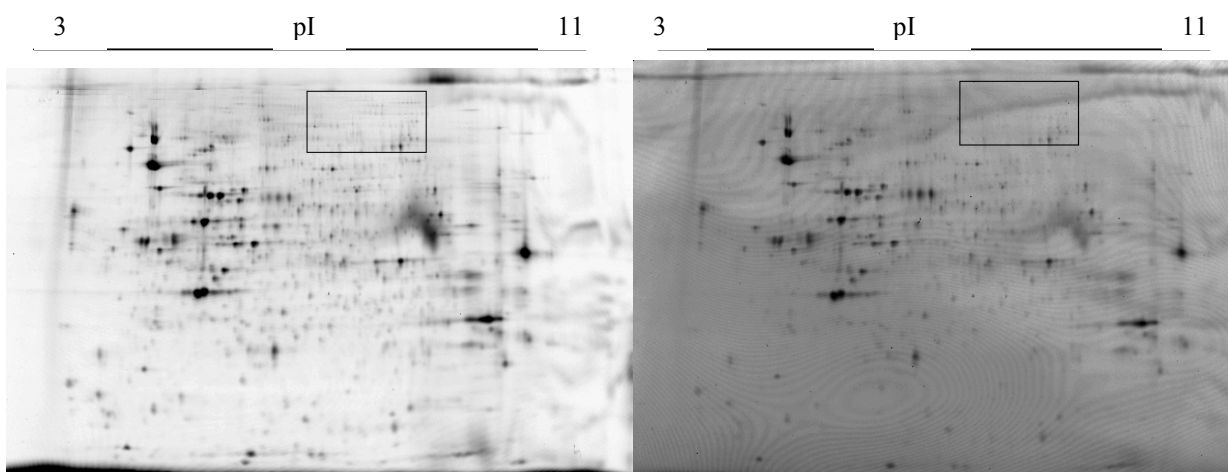
- A.** Hier ist der mittlere, obere Teil eines 2D-Gels dargestellt. Das gesamte Gel wurde für einen pH-Bereich von 3-11 aufgetrennt. Die gestochenen Spots sind mit den Ziffern 1-18 markiert.
- B.** Aus den gestochenen Gelspots wurden die Proteine eluiert und auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Die TopBP1 Antikörperdetektion wurde unter den gleichen Bedingungen wie im Westernblot durchgeführt. Als Positivkontrolle (linke und rechte obere Ecke) diente

rekombinantes TopBP1 Protein (pSH29). Für die Spots 1 und 3 ist eine positive Reaktion des Antikörpers zu erkennen.

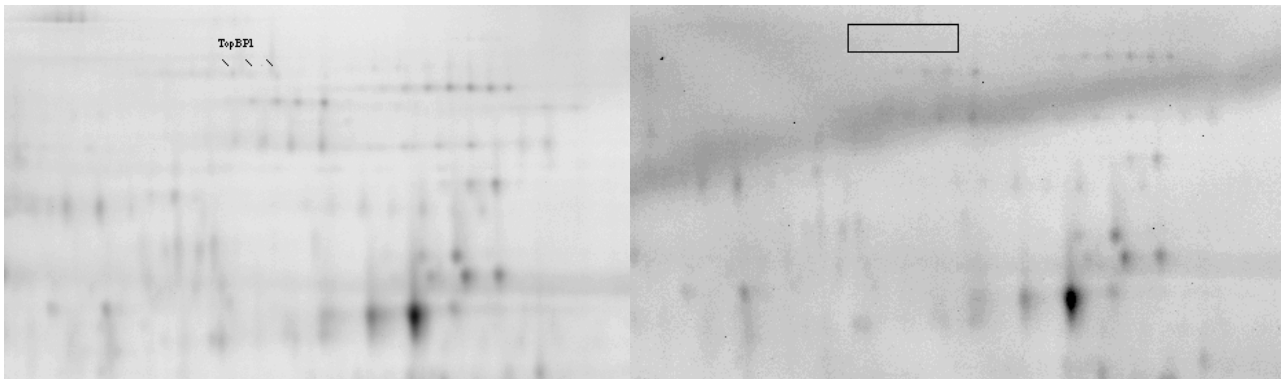
3.3.2. Vergleichende Analyse nach TopBP1 knock-down im 2D-Gel

Um den Einfluss eines TopBP1 knock-down auf die Expression von anderen Genen abschätzen zu können, ist es notwendig, möglichst viele Gene parallel betrachten zu können. Dazu wurden bereits verschiedene DNA-Array Versuche unternommen (Y. Wollmann, ZMB). Diese Versuche bestimmen den vorhandenen mRNA-Gehalt eines bestimmten Gens innerhalb einer Zelle. Inwieweit nachfolgende Prozesse Einfluss auf den tatsächlichen Proteingehalt nehmen, wird in dieser Methode außer Acht gelassen. Für den Vergleich des Proteingehalts einer normalen Zellpopulation mit einer Zellpopulation, in der TopBP1 durch siRNA vermindert exprimiert wird, sollte nun durch einen Proteom-Vergleich in der 2D-PAGE realisiert werden. Aus den vorangegangenen 2D-PAGE-Experimenten war der pI und das Molekulargewicht von TopBP1 im 2D-Gel bekannt. Somit konnte ein erfolgreicher Pull-Down direkt im 2D-Gel überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde die Methode der 2D-DIGE verwendet, die es ermöglicht, 2 unterschiedliche Proteinproben in einem Gel elektrophoretisch zu trennen. Hierdurch werden Unterschiede zwischen 2 Gelen die parallel getrennt werden, wie das Laufverhalten oder die Vernetzung, ausgeschlossen. Die Kontrollprobe wurde mit Cy5 markiert, die mit siRNA behandelte Probe mit Cy3. Die Gele wurden im Anschluss durch einen Laserscanner aufgenommen und ausgewertet.

A



B.

**Abb. 27 Vergleichende Analyse nach TopBP1 knock-down im 2D-Gel**

In Teil A sind zwei 2D-DIGE Gele mit einem pH-Gradienten von 3-11 abgebildet. Das linke Bild zeigt eine Übersicht des unbehandelten Kontroll-Lysat. Das rechte entspricht dem Proteom eines HeLa-Zell-Lysates, in dem durch siRNA die TopBP1 Expression inhibiert wurde.

Teil B zeigt die vergrößerten Ausschnitte der 2D-Gele. Im linken Ausschnitt des Kontrolllysates sind deutlich die TopBP1 Proteinspots zu erkennen. Im rechten Ausschnitt sind diese Spots in Folge der siRNA Behandlung der Zellen verschwunden.

Die Auswertung erfolgte sowohl über eine Software (Melanie 4), als auch visuell. In Abbildung 27 A ist die Gesamtübersicht eines Gels abgebildet. Die markierte Region entspricht dem weiter unten vergrößert dargestellten Bereich, in dem die TopBP1 Proteinspots liegen. Es ist zu erkennen, dass in der mit siRNA behandelten Probe diese Spots nicht weiter zu erkennen sind (Abb.27 B).

Die verwendete Software war nur bedingt in der Lage, die erkennbaren Spots zu erkennen und eine entsprechende differentielle Analyse der Kontrolle im Vergleich zum TopBP1-knock down Gel anzufertigen. Die von der Software als signifikant unterschiedlich exprimierten Spots hielten einer nachträglichen visuellen Überprüfung nicht stand. Die speziell für die DIGE Methode entwickelte Software stand zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

4. Diskussion

Das Protein TopBP1 ist in eine Reihe von Prozessen involviert, die in den DNA-Metabolismus einer Zelle eingreifen. Es ist bekannt, dass Mutationen im TopBP1-Gen Einfluss auf die Initiation der DNA-Replikation (Van Hatten et al., 2002, Hashimoto et al., 2003; Kim et al., 2005), die DNA-Reparatur an der Replikationsgabel (Mäkinen et al., 2005; Yamane et al., 2002), sowie die Signalweiterleitung im Falle einer DNA-Schädigung (Yamane et al., 2002; Xu et al., 2003; Kugami et al., 2006) haben.

In dieser Arbeit wurde die Expression von TopBP1 in humanen Zellen und die Regulation des Promotors unter dem Gesichtspunkt einer Beteiligung an der Antwort einer Zelle auf DNA-Schäden untersucht.

4.1. Identifizierung des Transkriptionsfaktors Egr-1 als Regulator des TopBP1-Gens

Das Topoisomerase-II β -bindende Protein 1 (TopBP1) wurde 1997 in einem Zwei-Hybrid-Screening mit der C-terminalen Region der Topoisomerase-II β als bait gefunden. Die Proteinstruktur von TopBP1 wird durch 8 BRCT-Domänen (BRCA1 Carboxy-Terminus) dominiert. BRCT-Domänen wurden ursprünglich im Genprodukt des BRCA1-Gens (breast cancer susceptibility gene 1) identifiziert (Koonin et al., 1996) und sind seitdem in einer Vielzahl weiterer Proteine gefunden worden, die häufig eine Rolle in Prozessen wie DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrollpunkten spielen (Bork et al., 1997; Callebaut & Mornon, 1997). Über diese BRCT-Domänen werden Interaktionen zwischen Proteinen vermittelt (Huyton et al., 1998). Des Weiteren versetzen sie TopBP1 in die Lage, die DNA zu binden. Diese Bindung benötigt keine Energiezufuhr und ist nicht an bestimmte Sequenzmotive gebunden, sie kann aber ausschließlich an Einzel- oder Doppelstrangbrüche erfolgen und nicht an intakter doppelsträngiger DNA. Im Fall von TopBP1 ist eine DNA-Interaktion für die BRCT-Domäne 1-2 und 6-8 gezeigt worden (Yamane & Tsuruo, 1999).

Darüber hinaus versetzten die BRCT Domänen TopBP1 in die Lage, eine Reihe von Proteinen durch direkte Interaktion zu binden (Huyton et al., 2000). Bekannte Interaktionspartner sind E2F1 (Liu et al., 2003), hRad9 (Mäkinen et al., 2001), hHyd (Honda et al., 2002), HPV16 E2 (Boner et al., 2002), Brg/Brm (Liu et al., 2004), PML (Xu et al., 2003) und Miz-1 (Herold et al., 2002). Auf Grund dieser Interaktionen wird TopBP1 zunehmend eine Beteiligung an der Schadensantwort einer Zelle zugeschrieben, insbesondere den Zellzykluskontrollpunkten am G1/S- und G2/M-Übergang sowie dem Checkpoint bei der meiotischen Rekombination. Es wird zunehmend diskutiert, dass TopBP1 eine Koordination und Regulation dieser Abläufe übernimmt.

Eines der Proteine, über das TopBP1 in die Zellzykluskontrolle eingreift, ist der Transkriptionsfaktor Myc-interacting zinc finger protein 1 (Miz-1). Miz-1 bindet die Promotoren der Gene *p21CIP1* und *p15INK4B* und aktiviert diese. Durch eine Assoziation von Myc an Miz-1 wird dieser Prozess negativ reguliert (Seoane *et al.*, 2001, 2002, Staller *et al.*, 2001, Herold *et al.*, 2002, van de Wetering *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2003, Brenner *et al.*, 2004). Es konnte in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass Miz-1 in der Zelle im Komplex mit TopBP1 vorliegt. Durch diese Komplexbildung ist Miz-1 in ungestressten Zellen nicht in der Lage, die Promotoren von *p21CIP1* und *p15INK4B* zu transaktivieren. Im Falle einer DNA-Schädigung, wie z.B. UV-Bestrahlung, konnte in humanen Keratinozyten gezeigt werden, dass Miz-1 aus diesem Komplex freigesetzt wird und im aktiven Zustand eine Hochregulierung der *p21CIP1*-Expression bewirkt (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus dieser Dissoziation ist noch unbekannt. Als Folge wird vermehrt das Protein p21 gebildet, welches die Aktivität der *cyclin dependent kinases* (cdk) negativ beeinflusst. Diese Kinasen sind essentiell für den Eintritt der Zelle in die S-Phase (Sherr & Roberts, 1999), so dass als Folge ein Zellzyklusarrest eintritt. Für diese p21-Kontrolle über Miz-1 ist die Regulation der TopBP1-Expression von großer Bedeutung. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich deshalb mit der Frage, wie die Expression von TopBP1 reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 *in vitro* und *in vivo* an den Promotor von TopBP1 bindet und diesen transaktiviert.

Über den Promotor von TopBP1 lagen nur wenige Daten vor. Der Startpunkt der Transkription ist bis heute nicht erschöpfend untersucht worden. In der Vergangenheit unternommene Anstrengungen, diesen genau zu bestimmen, führten nur zu unbefriedigenden und widersprüchlichen Ergebnissen. Als Grundlage für die Untersuchung des Promotors in dieser Arbeit wurde das 5'-Ende des größten bekannten cDNA Klons als Startpunkt der Transkription festgehalten (Yamane *et al.*, 1997). Unter Verwendung von Computerprogrammen (Gene2Promotor, MatInspector-professional; Genomatix GmbH, München), war es möglich, potentielle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Hauptaugenmerk lag hierbei auf Transkriptionsfaktoren mit einer bereits bekannten Funktion im Rahmen von Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur. Die Computeranalyse zeigte verschiedene mögliche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren auf, von denen einige in Abb. 6 dargestellt sind. Durch eine Deletionsanalyse der Promotorregion, konnte der kritische Bereich für die Aktivierung des Promotors weiter eingegrenzt werden. Es zeigte sich, dass in dem Bereich von -154bp bis zum Transkriptionsstart ausreicht, um eine normale Expression zu gewährleisten. Bei den Deletionen, die diesen Bereich weiter einkürzen, ist eine Verringerung der Promotoraktivität von über 90% zu verzeichnen. Die in diesem Bereich gelegenen Transkriptionsfaktorbindestellen wurden einer

genaueren Betrachtung unterzogen. Darunter befanden sich auch 2 Bindestellen in der Position -19 bp bis -27 bp und -41 bp bis -50 bp für Egr-1.

Die „early-growth-response“ (Egr) Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die aufgrund ihrer charakteristischen DNA-bindenden Domäne zu einer Familie zusammengefasst wurden. Die Familie umfasst Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Egr-4, die alle 3 aufeinanderfolgende Zinkfinger-Motive des Cys₂His₂-Typs als DNA-bindende Domäne besitzen. Alle Mitglieder erkennen ein GC-reiches DNA-Konsensusmotiv mit der Sequenz: GCG(G/T)GGGCG (Cao et al., 1990; Lemaire et al., 1990; Patwardhan et al., 1991). Für Egr-1 sind Bindestellen in Promotoren von Wachstumsfaktoren bekannt, wie zum Beispiel „insulin-like-growth faktor II“ (IGF), „platelet derived growth factor“ (PDGF-A und -B) (Khachigian et al., 1995 und 1996), „transforming growth factor β “ (TGF β) (Kim et al., 1989) und „colony stimulating growth factor (CSF) (Harrington et al., 1991). Weiterhin können Gene wie „tumor necrosis factor α “ (TNF α) (Yao et al., 1997), IL-2 (Skerka et al., 1995), „intracellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) (Maltzman et al., 1996) und Superoxiddismutase (SOD1) von Egr-1 beeinflusst werden. Alle diese Gene enthalten eine, meist aber mehrere Egr-1 Konsensusbindestellen in ihren Promotoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Egr-1 einen induktiven Effekt auf den TopBP1-Promotor hat. Durch eine Kotransfektion mit einem Egr-1-Expressionsplasmid unter der Kontrolle eines stark exprimierenden SV40 Promotors wurde in HeLa-Zellen eine Überexpression von Egr-1 erzielt. In diesen Zellen war eine signifikante Steigerung der Transkriptionsaktivität des TopBP1-Promotors von über 200% im Vergleich zur Expression in normalen HeLa-Zellen zu erkennen. Um sicherzustellen, dass die Aktivitätssteigerung auf eine vermehrte Bindung von Egr-1 an den TopBP1 Promotor zurückzuführen ist, wurden *in vitro* Interaktionsversuche unternommen. Der gezeigte DNA-Shift deutet auf eine direkte Bindung von Egr-1 an den TopBP1-Promotor hin. Zusätzlich lässt sich auf Grund des gewählten Oligonukleotids die Bindung auf die zuvor durch Computeranalysen gefundenen Egr-1 Konsensussequenzen eingrenzen. In den nachfolgenden Supershift-Experimenten gelang es, durch einen spezifisch gegen Egr-1 gerichteten Antikörper eine der Shiftbanden nachträglich auszulöschen, was die direkte Bindung von Egr-1 an die verwendete DNA zusätzlich unterstreicht. Durch die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) konnte die Bindung von Egr-1 auch im Zellsystem *in vivo* bestätigt werden. Diese Versuche gaben darüber hinaus Aufschluss, ob im ungestressten Zellsystem eine Bindung von Egr-1 an den Promotor von TopBP1 vorliegt. Es zeigte sich, dass der verwendete Antikörper in der Lage war, auch bei einem endogenen Proteingehalt von Egr-1 eine Bindung an den Promotor von TopBP1 nachzuweisen.

Die Proteine der Egr-Familie übernehmen Kontrollfunktionen bei Entwicklungs-, Wachstums- und Proliferationsprozessen in Zellen (Sukhatme et al., 1988; Cao et al., 1990). Sie liegen in normalen Zellen nur in sehr geringen Konzentrationen vor und werden erst durch bestimmte physiologische Prozesse in einer Zelle induziert. Die Egr-Proteine durchlaufen nach der Stimulation weitere Regulationsstufen, die posttranslationale Prozesse, wie z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung und Redoxpotenzierung mit einschließen. Diese Regulationsstufen und auch die Induktionszeiten variieren zwischen den verschiedenen Gewebe- und Zelltypen.

Im Genom des Menschen sind die für die Egr-Proteine codierenden Gene als Einzelkopien enthalten. Die Promotoren der Egr-Gene werden durch eine Vielzahl von Kontrollelementen reguliert. In der Promotorregion befinden sich „serum-response“-Elemente (SRE), SP-1 Motive, „calcium-response“-Elemente (CRE) und AP-ähnliche Bindesequenzen (Christy et al., 1988; Chavrier et al., 1989; Sakamoto et al., 1991). Speziell für Egr-1 wird die Expression durch Interleukine (IL-1 β , IL-1 α), TGF- β und INF- γ induziert (Nikam et al., 1998). Des Weiteren konnte für verschiedene Zelltypen eine UV-Induzierbarkeit nachgewiesen werden. Auch im Falle der in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zelllinie konnte nach einer Exposition der Zellen gegenüber UV-B Strahlung ein induktiver Effekt auf die Egr-1 Expression festgestellt werden (Abb.18). Die tatsächliche transkriptionelle Aktivität von Egr-Proteinen wird weiterhin durch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren moduliert. Diese Interaktionen können sowohl über DNA-Protein, als auch Protein-Protein Wechselwirkungen realisiert werden. Für diese Art einer kooperativen Expression von Egr mit anderen Transkriptionsfaktoren ist die Anordnung regulatorischer Elemente im Promotor von großer Bedeutung. Auch die räumliche Lage der Bindestellen zueinander spielt eine große Rolle. Für einige Promotoren Egr-regulierter Gene ist bekannt, dass die Egr-1 Bindestellen mit denen von SP-1 überlappen (Krämer et al., 1994; Skerka et al., 1995; Decker et al., 1998). Es sind auch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren bekannt, wie z.B. NF κ B, bei denen die Bindestellen nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen (Zipfel et al., 2003). Auch für das Tumorsuppressorgen p53 ist eine Komplexbildung mit Egr-1 bekannt (Liu et al., 2001). Um für den TopBP1-Promotor eine mögliche Abhängigkeit zwischen der oben gezeigten Egr-1 Bindung und regulatorischen Elementen anderer Transkriptionsfaktoren zu finden, wurden verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt. Über den selektiven Wegfall weiterer Bindestellen sollten sowohl Effekte auf das Grundniveau der TopBP1 Expression, als auch auf den transaktivierenden Effekt durch eine Egr-1 Überexpression beobachtet werden.

In Abb. 5 ist zu erkennen, dass die Deletionskonstrukte D1-D4 keinerlei signifikante Unterschiede aufweisen. Die Deletionen hatten weder auf das Grundniveau, noch auf die Induktion durch Egr-1 einen Einfluss. Das Deletionskonstrukt D5 hingegen, welches im Vergleich zu D4 um weitere 58bp

eingekürzt wurde, zeigt in der Grundexpression einen Abfall auf weniger als 5%. Zusätzlich dazu war, trotz der immer noch enthaltenen Egr-1 Bindestelle, keine Induktion des Promotors nach Egr-1 Überexpression mehr möglich. Es ist bekannt, dass in der deletierten Region eine Bindestelle für E2F1 liegt, welche für die E2F1-induzierte Aktivierung des TopBP1 Promotors verantwortlich ist (Liu et al., 2003; Liu et al., 2004; Yoshida et al., 2004). Die Funktionen, die E2F1 in der Zelle übernimmt, geben weiter Aufschluss über die Stellung von TopBP1 im DNA-Metabolismus einer Zelle.

E2Fs spielen eine maßgebliche Rolle bei der Koordinierung vieler zellulärer Prozesse. E2F1 reguliert das Verlassen der G0-Phase und die initiale G1-Phase (Wang et al., 1998; Leone et al., 1998). E2F1 besitzt auch eine oncogene Funktion in der Zelle. Von Pierce et al. konnte gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen eine Überexpression von E2F1 die Tumorgenese vorantreibt. In weiterführenden Experimenten konnte auch der Umkehrschluss in einer doppelt negativen E2F1 Mutante bewiesen werden, die daraufhin eine deutlich verlangsamte Karzinogenese als der Wildtyp zeigte (Yamasaki et al., 1998). Eine einfache Überexpression von E2F1 genügte jedoch nicht für die Neuentwicklung von Tumoren. Der Verlust von funktionellem p53 oder aktiviertem Ras muß mit einer Deregulation von E2F1 für eine Tumorneuentstehung einhergehen. Dieser Umstand ist auf die zweite Funktion von E2F1 zurückzuführen, der Induktion von Apoptose (Pierce et al., 1998). Die E2F1-induzierte Apoptose wird sowohl über p53-abhängige Signalkaskaden vermittelt (Qin et al., 1994; Pierce et al., 1998), als auch unabhängig von diesen (Philips et al., 1997). Als ein Beispiel für die von p53 unabhängig induzierte Apoptose konnte p73 als Zielgen von E2F1 identifiziert werden und die hierüber induzierte Apoptose nachgewiesen werden (Irwin et al., 2000). Auf diesem Weg wird der „apoptosis protease-activating factor 1“ (Apaf-1) induziert, der mit dem aus den Mitochondrien freigesetzten Cytochrom C einen Komplex bildet, der die Pro-Caspase 9 aktiviert. Hierdurch wird die Apoptose eingeleitet (Zou et al., 1999). Die über p53 induzierte Apoptoseinduktion ist auf eine Stabilisierung von p53 durch E2F1 zurückzuführen. Diese wird zum einen durch eine Induktion von p14^{ARF} realisiert, welches verhindert, dass p53 ubiquitinyliert wird und somit die anschließende Degradation vermeidet (Russel et al., 2002; Tolbert et al., 2002). Es konnte auch eine direkte Interaktion von E2F1 mit p53 gezeigt werden, die vermutlich ebenfalls eine stabilisierende Wirkung hat (Hsieh et al., 2002). Die notwendige E2F1-Aktivität während des G1/S Übergangs und die Funktion als Induktor von p73, p53 und Apaf-1 bringen E2F1 in Verbindung mit der Schadensantwort der Zelle und seiner Teilnahme in den sogenannten „DNA-damage checkpoints“. TopBP1 ist in der Lage, die Apoptose induzierende Funktion von E2F1 zu regulieren. TopBP1 interagiert mit E2F1 über die 6. BRCT Domäne und dem N-Terminus von E2F1 (Liu et al., 2003). Dieser Bindung geht eine ATM-vermittelte Phosphorylierung von E2F1 am

Ser 31 voraus, die durch DNA-Schädigung induziert werden kann. Als Folge davon wird E2F1 zu sogenannten „DNA damage-induced foci“ rekrutiert und seine transkriptionelle und apoptose-induzierende Fähigkeit unterdrückt.

In der Arbeit von Yoshida et al. (2004) wurde ein Einfluss von E2F1 auf den Promotor von TopBP1 beschrieben. Die in der Position –110 bis –96 bp liegende Region zeigt nach Bindung durch E2F1 eine transaktivierende Wirkung auf die Expression von TopBP1. Im Rahmen der in der Arbeit dargestellten Deletionsanalysen (Abb.7) konnte nach dem Wegfall der E2F1-Bindestelle ein deutlicher Rückgang der Transkriptionsaktivität verzeichnet werden. Durch gezielte Mutagenese der bereits bekannten E2F1-Bindestelle und der neuen Egr-1-Bindestelle sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Bei der Mutation der Egr-1 Bindestelle zeigte sich, dass der induktive Effekt einer Überexpression nicht mehr erzielt werden kann. Die Bindung von Egr-1 an dieser Stelle hat auf das normale Expressionsniveau von TopBP1 keinen Einfluss im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Mutation der E2F-Bindestelle nahm sowohl das Grundexpressionsniveau, als auch die Induktion durch Egr-1 deutlich ab. Dieses Ergebnis geht mit den Daten aus der Deletionsanalyse des TopBP1-Promotors konform, in der trotz weiterhin vorhandener Egr-1-Bindestelle in Konstrukt D5 keine Induktion mehr erzielt werden kann. Dies stützt die These, dass für eine Steigerung der Transkription von TopBP1 durch Egr-1 eine kooperative Interaktion mit E2F1 nötig ist. Es ist in vorangegangenen Arbeiten gezeigt worden, dass Egr-1 selbst nur ein schwacher Aktivator der Transkription von Genen ist, und sein Einfluss auf Promotoren häufig mit der Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren einhergeht, wie z.B. NFAT und NFκB (Decker et al., 2003; Wieland et al., 2005). Die Befunde aus der Deletionsanalyse des TopBP1 Promotors und die Abhängigkeit einer Egr-1 bedingten TopBP1 Induktion von einer intakten E2F1-Bindestelle führten zu der These, dass die beiden Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt über weitere Faktoren miteinander interagieren.

In Kooperation mit Christine Skerka (Abteilung für Infektionsbiologie, HKI Jena) wurde rekombinantes Egr-1 Protein hergestellt und an einer Nickelsäule immobilisiert. Für die Interaktionsversuche wurden HeLa-Zellen durch Transfektion mit einem Expressionsvektor zu einer Überexpression von E2F1 angeregt. Das gewonnene Proteinlysate wurde für die *in vitro* Interaktion über die Nickelsäule gegeben. Nach verschiedenen Waschschritten wurden die Proteine von der Säule eluiert und über ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit einem spezifischen Antikörper konnte im anschließenden Westernblot E2F1 detektiert werden. Im Rahmen dieser Interaktionsstudien konnte erstmals gezeigt werden, dass Egr-1 und E2F1 *in vitro* die Fähigkeit besitzen, miteinander eine direkte Interaktion zu realisieren (Daten von C. Skerka, HKI Jena).

Die Proteine der Egr- und E2F-Familie werden in Zusammenhang mit Zellzyklusregulation und Apoptose gebracht. Diese Prozesse sind in einer Zelle unter strenger Kontrolle und werden durch Netzwerke und Signalkaskaden ausgelöst und reguliert. In Falle einer Schädigung der DNA müssen diese Netzwerke sicherstellen, dass der Zellzyklus angehalten wird um den anlaufenden Reparaturmechanismen die Zeit für ein Beheben der Schäden zu geben. Des Weiteren muss es Sensorsysteme geben, die in der Lage sind, diese Schäden in ihrer Art und Schwere zu qualifizieren und gegebenenfalls Apoptose einzuleiten. Diese Netzwerke sind unter dem Begriff der „DNA-damage checkpoints“ zusammengefasst.

Für eine Beteiligung von TopBP1 an der Schadensantwort einer Zelle gibt es Vielzahl an Hinweisen. TopBP1 übernimmt in diesem checkpoint eine koordinierende Funktion. Während des G1/S Übergangs wird TopBP1 durch die Bindung von E2F1 an seinen Promotor induziert (Liu et al. 2004). Innerhalb der E2F-Familie fungieren E2F1, E2F2 und E2F3 als transkriptionelle Aktivatoren und E2F4 bzw. E2F5 als Transkriptionsrepressoren. E2F1 ist als Induktor für die Expression weiterer Proteine bekannt, die mit Apoptose und Zellzykluskontrolle in Verbindung gebracht werden, wie z.B. p73, p53 und Apaf-1. Auf der anderen Seite ist TopBP1 in einem feed-back artigen Regulationsmechanismus eingebunden, der die E2F1-vermittelte Apoptose inhibiert. Im Falle einer Überexpression von TopBP1 in HEK293-Zellen konnte eine Interaktion zwischen TopBP1, Brg1/Brm und E2F1 nach der Zugabe von Neocarzinostatin, einen UV-Mimetikum, gezeigt werden (Liu et al., 2004). Diese Bindung ist E2F1-spezifisch und konnte nicht bei anderen Mitgliedern der E2F-Familie beobachtet werden. Der Bindung muss eine Phosphorylierung von E2F1 durch ATM vorausgehen. E2F1 wird nach der Bindung an TopBP1 in sogenannte nukleäre Foci rekrutiert und ist hiernach nicht mehr in der Lage, Apoptose auszulösen. Die Induktion von TopBP1 durch E2F1 und die anschließende Bindung von E2F1 durch TopBP1 und Brg/Brm formt eine Feed-Back-Schleife, die der Zelle die Zeit gibt, vorhandene DNA-Schäden zu beheben.

Die Egr-Proteine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei Entwicklungs-, Wachstums- und Proliferationsprozessen. Egr-Proteine gehören zu den induzierten Transkriptionsfaktoren und liegen dementsprechend in der Zelle nur in geringen Expressionsraten vor. Eine Induktion der Expression erfolgt meist schnell und spiegelt laufende physiologische Prozesse wider. Nach UVB-Bestrahlung konnte die Rekrutierung des NFκB-Proteins p65 (RelA) an den Promotor von Egr-1 gezeigt werden (Thyss et al., 2004). Die Folge ist eine erhöhte Egr-1-Expression. Egr-1 ist in der Lage, die Promotoren von Gadd45a und Gadd45b zu binden und zu stimulieren. Die Proteine der Gadd45 Familie gehören zu den durch DNA-Schäden induzierten Genen. Sie spielen bei Wachstumskontrolle und Zellzyklus-Checkpoints eine Rolle. Durch Assoziation mit p21^{WAF/CIP1}, Cdc2/CyklinB nehmen sie auch an DNA-Reparaturmechanismen teil (Smith et al., 1994). Durch die

Aktivierung von JNK und p38 MAPK (Hildesheim et al., 2002) werden die Proteine der Gadd45-Familie auch mit Prozessen der Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht.

In Gegensatz zu der Induktion von Egr-1 und E2F1 nach der Schädigung einer Zelle durch UV-Strahlung konnte eine derartige Induktion für TopBP1 bisher nicht nachgewiesen werden. In verschiedenen Versuchen mit TopBP1-Reporterplasmiden in HeLa-Zellen konnte nach einer UV-Bestrahlung keine signifikante Erhöhung der Expression beobachtet werden. Es ist sogar gezeigt worden, dass der mRNA-Gehalt von TopBP1 in der Zelle nach einer UV-Bestrahlung zurückgeht (Pötter et al., 200; Herold et al., 2002). Dieser UV-vermittelte mRNA-Abfall von TopBP1 konnte durch eine zeitweilige Repression des Promotors erklärt werden. Yosida und Inoue (2004) konnten nach Bestrahlung der diploiden Coloncarzinomzelllinie HCT116 einen Austausch von E2F1 durch E2F4 am TopBP1 Promotor beobachten. Die Rekrutierung der Repressors E2F4 könnte zu einem Aussetzen der TopBP1-Expression führen.

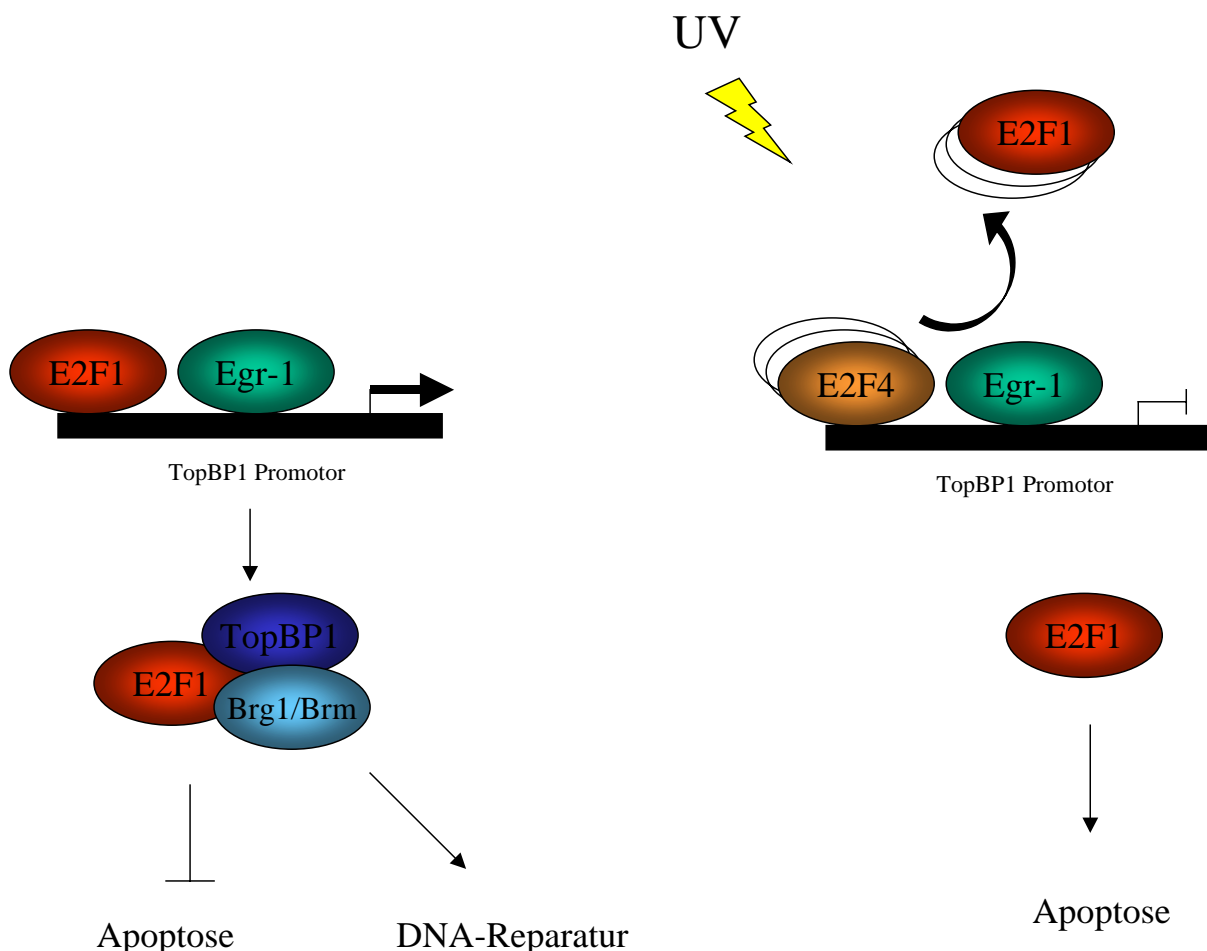


Abb. 28 Modell für einen hypothetischen Mechanismus für die Dissoziation des E2F1 vom TopBP1 Promotor und die Rekrutierung von E2F4 nach DNA-Schädigung

In ungestressten Zellen liegt eine Bindung von Egr-1 und E2F1 an den TopBP1 Promotor vor. Die Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren an den TopBP1 Promotor führen zu einer Expression von TopBP1. Durch die Bindung an Brg1/Brm und E2F1 kommt es zu

einer TopBP1-vermittelten Inhibition der Apoptose. Im Falle einer DNA-Schädigung durch UV-Strahlung erfolgt eine Rekrutierung von E2F4 an den TopBP1-Promotor und einer Repression von TopBP1. Die E2F1-vermittelte Apoptose kann nicht durch TopBP1 inhibiert werden.

Im Falle irreparabler DNA-Schäden muss es Regulationsmechanismen geben, die zwischen einer DNA-Reparatur und dem Einleiten der Apoptose diskriminieren können. Durch die Fähigkeit von TopBP1, die E2F1-vermittelte Apoptose zu reprimieren, lässt sich ein hypothetisches Modell für einen Regulationsmechanismus formulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Egr-1 mit dem TopBP1-Promotor *in vitro* und *in vivo* interagiert. Die Einbindung von Egr-1 als „early-growth-response-gen“ in Prozesse der Wachstumskontrolle, Schadensantwort auf UVB-Strahlung und Einleitung der Apoptose über seine Zielgene wurde in der Vergangenheit häufig untersucht. Es ist bekannt, dass die Rolle von Egr-1 als Aktivator der Transkription in der Regel von der Interaktion weiterer Transkriptionsfaktoren in der Nähe der Egr-1 Bindestelle abhängt. Für den TopBP1 Promotor konnte eine Abhängigkeit zwischen der E2F1 Bindestelle und der Transaktivierung durch Egr-1 festgestellt werden. Darüber hinaus ist eine direkte Protein-Protein Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren *in vitro* festgestellt worden. Die Frage, inwieweit diese Interaktion notwendig für eine Transaktivierung des TopBP1-Promotors ist bedarf noch weiterer Untersuchungen.

4.2. TopBP1 knock-down durch RNA-Interferenz

Die DNA-damage checkpoints stellen sicher, dass in einer Zelle die genomische Integrität aufrecht erhalten wird. Ihre Aufgabe besteht darin zu überprüfen, ob eine Schädigung vorliegt, gegebenenfalls den Zellzyklus anzuhalten und Reparaturmechanismen einzuleiten, oder im Falle irreparabler Schäden Apoptose zu induzieren. Für diese Prozesse sind eine Vielzahl von Proteinen in Netzwerken organisiert, die durch Kaskaden und Feedback-Hemmungen die Signale weiterleiten, kanalisieren und verstärken. Das humane Protein TopBP1 wird in Zusammenhang mit diesen Checkpoints als ein wichtiger Koordinator mit Verbindung zur Replikation, zum G1/S-checkpoint (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2005, Osborn *et al.*, 2002) und dem G2/M-checkpoint (Mäkinen *et al.*, 2001, Greer *et al.*, 2003, Yamane *et al.*, 2003) genannt. TopBP1 weist deutliche Homologien zu Proteinen auf, wie *Schizosaccharomyces pombe* Cut5/Rad4 (Saka *et al.*, 1993, 1994, Marchetti *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* Dpb11 (Wang & Elledge, 1999, 2002), *Drosophila* Mus101 (Yamamoto *et al.*, 2000) und *Xenopus* Xmus101/cut5 (Parrilla-Castellar &

Karnitz, 2003), die in anderen Organismen in diesen Kaskaden organisiert sind. Es existieren eine Reihe von Modellen, in denen Zusammenhänge zwischen TopBP1 und weiteren Proteinen diskutiert werden (siehe 4.1.), jedoch ist davon auszugehen, dass diese Netzwerke eine Reihe weiterer Proteine mit einschließen. Durch seine Struktur, die von acht BRCT-Domänen dominiert wird, ist TopBP1 in der Lage, eine Reihe von Protein-Protein-Interaktionen einzugehen (Bork *et al.*, 1997, Manke *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2003). Wie oben bereits diskutiert, reguliert TopBP1 als Korepressor die transkriptionelle Aktivität von E2F1, indem es Brg1/Brm zu E2F1-empfindlichen Promotoren rekrutiert (Liu *et al.*, 2004). Durch eine Interaktion mit HPV16 E2 übernimmt TopBP1 auch die Funktion als transkriptioneller Koaktivator (Boner *et al.*, 2002).

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Identifizierung beteiligter Signalproteine und deren Reihenfolge in den Kaskaden gemacht worden sind, ist davon auszugehen, dass es weitere Komponenten gibt, die an diesen Signalwegen teilnehmen.

Zur Identifizierung weiterer beeinflusster Gene sind bereits erste Versuche im Hinblick auf deren Genexpression mit der Microarraytechnologie erfolgt. Hierzu wurde in Kolonkarzinomzellen mittels RNAi ein gezielter knock-down von TopBP1 vorgenommen und mit dem Expressionsmuster der Kontrollzellen verglichen. Inwieweit die tatsächliche Proteinkonzentration der beeinflussten Gene sich nach einem knock-down von TopBP1 verändert, konnte bislang nicht geklärt werden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Methoden zu etablieren und zu validieren, mit deren Hilfe die Expression von TopBP1 in humanen Zellen herunterreguliert werden kann, um das Proteinmuster dieser Zellen mit dem von unbehandelten Kontrollzellen vergleichen zu können.

Zunächst sollten verschiedene RNAi-Techniken evaluiert werden. Als Ausgang wurde die bereits in den vorangegangenen Microarray-Versuchen verwendete vektorbasierende Technik herangezogen. Diese Methode beruht auf dem pSUPER Vektor (Brummelkamp *et al.*, 2002) in den eine TopBP1-spezifische DNA-Matrize kloniert wurde. Durch eine transiente Transfektion wird dieser Vektor in die Zelle eingebracht und die Synthese der siRNA erfolgt in den transfizierten Zellen *in vivo*. Durch eine Kotransfektion mit einem Vektor, der eine Antibiotika-Resistenzdeterminante (Puromycin) enthält, wurde im Anschluss eine Selektion durchgeführt, die eine homogen transfizierte Zellpopulation gewährleisten sollte. Die mitgeführte 0-Kontrolle zeigte nach der Selektion keine Veränderung in der TopBP1 Konzentration, wohingegen die mit pSUPER-behandelten Zellen eine Abnahme um bis zu 80% zeigten. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Proteinkonzentration von cdk-2 überprüft. Diese blieb durch die pSUPER-Behandlung unbeeinflusst, was darauf hindeutet, dass der beobachtete RNAi-Effekt TopBP1-spezifisch ist.

Als zweite Methode zur Verminderung der TopBP1-Expression wurde eine Technik verwendet, bei der die siRNAs direkt durch transiente Transfektion in die Zelle eingebracht wurde. Diese 21bp langen Nukleotide wurden durch Lipofektion transfiziert, was eine Transfektionsrate von über 90% erzielt. In Kontrollversuchen konnten diese Transfektionsraten mit einer GFP-markierten siRNA bestätigt werden. Dank dieser Technik konnte auf Grund derart hoher Transfektionsraten auf eine anschließende Selektion mit Antibiotikum verzichtet werden. Der Effekt auf die Expression zeigte im Westernblot eine Abschwächung der Proteinkonzentration von TopBP1 um 80-90%. Auch hier blieb die mitgeführte cdk-2 Kontrolle durch die siRNA-Behandlung unbeeinflusst. Der größte Vorteil eines durch siRNA herbeigeführten knock-downs von TopBP1 ist der Verzicht auf eine anschließende Selektion durch Antibiotika. Nur kurzfristig durch einen knock-down von TopBP1 herbeigeführte Effekte können durch die langfristige Selektion verloren gehen, oder durch sekundäre Effekte überlagert werden. Zusätzlich kann der durch den Selektionsdruck ausgelöste Streß zu einem veränderten Expressionsmuster bestimmter Gene in der Zelle führen. Zusammengekommen mit der deutlich höheren Transfektionsrate wurde diese Methode für die weiteren Versuche verwendet.

Zur Untersuchung des Effekts eines TopBP1 knock-downs auf den Phänotyp einer Zellpopulation wurden diverse Wachstumsversuche durchgeführt.

Die verwendeten HeLa-Zellen zeigten nach einem TopBP1 knock-down nach 48 Stunden ein leicht vermindertes Zellwachstum. Die verminderte Zellviabilität nimmt mit der Zeit zu, so dass nach 72 Stunden das geringere Wachstum deutlich zu erkennen ist. Die Zellen, in denen zusätzlich eine DNA-Schädigung durch UVB-Strahlung erzeugt wurde, zeigten ein weitaus stärker vermindertes Wachstum. Im Fall des induzierten TopBP1 knock-downs und einer DNA-Schädigung sind nach 72 Stunden bereits über 90% der Zellen abgestorben.

Eine Erklärung hierfür ist die bereits unter 4.1. angesprochene Korepressorfunktion von TopBP1 auf E2F1 (Liu *et al.*, 2004). Als Reaktion auf Wachstumssignale wird das Retinoblastomprotein (Rb) durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert. Als Folge davon wird E2F aus dem Komplex mit Rb freigesetzt und aktiv. Diese Freisetzung ist notwendig für den G1/S Übergang. Die Familie der E2F-Proteine besteht aus 8 Proteinen (E2F 1-8), die unterschiedliche Funktionen ausführen. Die Funktion von E2F1 als Apoptoseinduktor spielt für den hier beschriebenen Vorgang zur Vermeidung einer onkogenen Transformation wahrscheinlich eine wichtige Rolle (Pan *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 2001). Bei einer Schädigung der DNA wird E2F1 durch ATM und Chk2 phosphoryliert und dadurch aktiviert. TopBP1 wird in diesem Modell als Korepressor von E2F1 diskutiert, der die E2F1 vermittelte Apoptose unter normalen Wachstumsbedingungen aussetzt und im Falle einer DNA Schädigung durch diese Repression eine DNA-Reparatur ermöglicht. Durch einen gezielten

knock-down von TopBP1 würde dieser Mechanismus außer Kraft gesetzt werden und es E2F1 ermöglichen, seine Zielgene zu aktivieren. Liu et al. konnten bereits in verschiedenen Zelllinien eine Expression der Zielgene Cyclin E, p73, Pockettprotein p109 und TK nach einem knock-down von TopBP1 zeigen. Zusätzlich stieg die Expression von E2F1 weiter an. Durch DNA-schädigende Agenzien (Adriamycin) konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Weiterhin konnte eine E2F1-abhängige Apoptose in diesen Zellen durch den TopBP1 knock-down beobachtet werden.

Die durchgeführten Zellwachstumsversuche zeigten aber auch, dass der alleinige TopBP1 knock-down in den Zellen nicht ausreichte, um Apoptose zu induzieren. Erst nach einer DNA-Schädigung ist die erhöhte Empfindlichkeit der depletierten Zellen im Wachstumsversuch signifikant. TopBP1 wird zunehmend eine koordinierende Rolle bei DNA-Replikation und DNA-Schadensantwort zugeordnet. Die Tatsache, dass in TopBP1-depletierten Zellen nach einer DNA-Schädigung die Überlebensrate der Zellen drastisch sinkt, unterstützt die Teilname von TopBP1 an Prozessen zur Erhaltung der genomischen Integrität weiter.

4.3. Differentielle Genexpression nach TopBP1 knock-down

Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine hohe Komplexität und Redundanz in den Mechanismen zur Regulation des Zellzyklus hin. Die diskutierte zentrale Rolle von TopBP1 in diesem Netzwerk macht einen Einfluss auf eine Vielzahl weiterer Faktoren wahrscheinlich. Aus diesem Grund wurden erste Versuche zur differentiellen Proteinexpression in Kontrollzellen und TopBP1 knock-down Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die zum Proteomvergleich verwendete 2D-Elektrophorese ermöglicht es komplexe Proteingemische aufzutrennen und in einer nachfolgenden Massenspektrometrie eine Strukturanalyse der einzelnen Proteine durchzuführen. In der Theorie sind nach einer elektrophoretischen Auftrennung alle Proteine im Gel sichtbar zu erkennen. Den heutigen Methoden sind hierbei allerdings weiterhin Grenzen gesetzt. Bei Proteinen mit einem sehr geringen Expressionsniveau ist die Gefahr eines Unterschreitens der Detektionsgrenze durch Verluste bei der Probenaufbereitung und der Elektrophorese selbst sehr hoch. Dies betrifft gerade regulatorische Proteine, die häufig nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen. Die Darstellung von basischen Proteinen ist trotz verbesserter isoelektrischer Fokussierungsmethoden problematisch. In diesem Fall ist die Wahl des pH-Gradienten für die IEF von großer Bedeutung. Bei hydrophoben Proteinen besteht zusätzlich die Gefahr, dass diese nicht vom Gel aufgenommen werden.

Die Probenaufbereitung nimmt eine Schlüsselrolle für die spätere Darstellung des Proteoms im 2D-Gel ein. TopBP1 besteht aus 1522 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 170 kDa.

Der in den 2D-Gelexperimenten experimentell ermittelte pI von TopBP1 liegt bei 6.4. Durch die Verwendung von hochmolarem Harnstoff während der Probenaufbereitung ist es möglich, auch schwerlösliche Proteine in Lösung zu bringen. Ein weiterer Aspekt ist, dass durch den Harnstoff denaturierende Bedingungen geschaffen werden, durch die Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen reversibel zerstört werden. Dadurch können Protein-Protein Interaktionen vermieden werden.

Auch die Wahl der Färbemethode ist von großer Bedeutung. Es musste ein hohes Maß an Sensitivität erreicht werden, da davon auszugehen ist, dass viele der von TopBP1 beeinflussten Gene Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine sind und daher nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Färbemethode für Proteinspots im Polyacrylamidgel. Die Sensitivität ist 100-Mal höher als die einer Coomassie-Färbung und reicht fast an die der Autoradiographie heran. Neben Nachteilen wie Abweichungen in der Färbeintensität bei nicht simultan gefärbten Gelen, welche sich durch eine geeignete Software normalisieren lassen, verändert die Silberfärbung die Endgruppen von Proteinen. Selbst nach dem Entfärben der Proteinspots ist eine massenspektrometrische Analyse nur bedingt möglich.

Eine speziell für differentielle Genexpressionsstudien entwickelte Färbemethode ist die „2D-Fluorescence difference Gel Electrophoresis“ (2D-DIGE). Hierbei werden je Probe verschiedene Fluorochrome unspezifisch an die Proteine gekoppelt. Diese Bindung wird über eine reaktive Estergruppe am Fluorochrom realisiert. Hierdurch können maximal 3 verschiedene Proben (Cy2, Cy3 und Cy5) in einem Gel aufgetrennt werden. Die Visualisierung erfolgt in einem Fluoreszenzscanner mit 3 Lasern. Das Prinzip der 2D-DIGE-Technologie wurde ausführlich in der Einleitung erklärt. Mit Hilfe der verwendeten 2D-DIGE-Technologie war es möglich, das unterschiedliche Laufverhalten zweier Gele als Fehler auszuschließen.

Als Vorbedingung für die Analyse eines Proteinlysats, in dem die TopBP1-Konzentration mittels siRNA vermindert wurde, war die Lokalisation der TopBP1-Spots im 2D-Gel. Hierzu wurden, ausgehend vom Molekulargewicht und dem pI von TopBP1, in Frage kommende Proteinspots aus dem 2D-Gel gestochen und die in Lösung gebrachten Proteine im Dot-Blot analysiert. Es zeigte sich, dass gleich 3 Proteinspots positiv auf den TopBP1-spezifischen Antikörper reagierten. Alle 3 Spots bildeten eine horizontale Reihe, die keine Unterschiede im Molekulargewicht aufweisen. Lediglich der pI variierte. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Vor- bzw. Abbaustufen von TopBP1 handelt.

Nach der Identifizierung von TopBP1 war es auch im 2D-Gel möglich den zuvor im Westernblot beobachteten knock-down von TopBP1 nach siRNA-Behandlung darzustellen. Die verwendete Analysesoftware war nur bedingt in der Lage, Unterschiede im Expressionsmuster der Gele zu

erkennen. Trotz der nahezu 100% identischen Laufeigenschaften der Cy3 und Cy5 markierten Proben gab es eine Reihe von Spots, die von der Software als signifikant unterschiedlich ausgegeben wurden, die sich nach visueller Überprüfung aber als nicht haltbar erwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein System zu etablieren, das es in Zukunft ermöglicht, den Einfluss eines TopBP1-knock-downs im HeLa-Zellsystem auf das gesamte Proteom zu analysieren. Die beobachteten Abweichungen im Expressionsmuster können mit den bereits vorhandenen Microarraydaten verglichen werden und neue Hinweise auf den Einfluss von TopBP1 auf diese Proteine aufzeigen.

4.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit identifiziert den Transkriptionsfaktor Egr-1 als einen Regulator des TopBP1 Promotors. Die Einbindung von Egr-1 als „early-growth-response-gen“ in Prozesse der Wachstumskontrolle, Schadensantwort auf UVB-Strahlung und Einleitung der Apoptose über seine Zielgene liefert weitere Hinweise auf eine Funktion von TopBP1 in den DNA-damage checkpoints. Die Abhängigkeit der Induktion durch Egr-1 von der bereits bekannten E2F1-Bindestelle muss noch eingehender untersucht werden. Neue Daten deuten auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren hin.

Des Weiteren konnte eine Methode etabliert werden, die den Grundstein für umfassende Proteomstudien nach einem TopBP1-knock-down legt. Hierdurch kann der Einfluss von TopBP1 auf weitere Proteine und die koordinierende Funktion von TopBP1 in den DNA-damage checkpoints analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Khodairy, F., Carr, A.M.** (1992): DNA-repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **4**: 1343-1350.
- Araki, H., Leem, S.-H., Phongdara, A., Sugino, A.** (1995): Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(ϵ) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11791-11795.
- Bae, J., Donigia, J.R., Hsueh, A.J.W.** (2003): Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. **278**: 5195-5204.
- Bell, S.P., Dutta, A.** (2002): DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, L., Bernards, R.** (2004): A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nat* **428**: 431-437.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.** (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nat* **409**: 363-366.
- Bernstein, E., Denli, A.M., Hannon, G.J.** (2001): The rest is silence. *RNA* **7**: 1509-1521.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boner, W., Taylor, E.R., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M.S., Morgan, I.M.** (2002): A functional interaction between the human Papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem* **277**: 22297-22303.
- Borden, K.L.B.** (2002): Pondering the Pomyelocytic leukaemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* **22**: 5259-5269.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., Koonin, E.V.** (1997): A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* **11**: 68-76.
- Bowen, H., Lapham, A., Phillips, E., Yeung, I., Alter-Koltunoff, M., Levi, B.-Z., Perry, V.H., Mann, D.A., Barton, C.H.** (2003): Characterization of the murine *Nramp1* promoter. Requirements for transactivation by Miz-1. *J Biol Chem* **278**: 36017-36026.

- Boyd, J.B., Setlow, R.B.** (1976): Characterization of postreplicative repair in mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. *Genet* **84**: 507-526.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launot, Y., Di Croce, L., Fuks, F.** (2004): Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO*
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-553.
- Callbaut, I., Monon, J.-P.** (1997) : From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters* **400**: 25-30.
- Cao, X., Koski, R.A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C.F., Gaffney, R., Hay, R.V. and Sukhatme, V.H.** (1990): Identification and characterization of Egr-1 gene product, a DNA-binding Zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1931-1939.
- Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P.** (1963): Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 39-43.
- Chavrier, P., Janssen-Timmen, U., Mattei, M.G., Zerial, M., Bravo, R., Charnay, P.** (1989): Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol. Cell. Biol.* **9**(2):787-97.
- Christy, B.A., Lau, L.F. and Nathans, D.** (1988): A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7857-7861.
- Decker, E., Skerka, C. and Zipfel, P.F.** (1998): The early growth response protein (Egr-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J. Biol. Chem* **273**: 26923-26930.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., Leder, P.** (1995): Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**: 675-684.
- Diffley, J.F.** (1996): Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev* **10**: 2819-2830.
- Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J.M.** (1991): The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* **10**: 133-141.
- Eisenman, R.N.** (2001): Deconstructing Myc. *Genes Dev* **15**: 2023-2030.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.** (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R.** (1995): Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**: 2910-2919.
- El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., Caldecott, K.W.** (2003): A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **31**: 5526-5533.
- Fien, K., Cho, Y.S., Lee, J.K., Raychaudhuri, S., Tappin, I., Hurwitz, J.** (2004): Primer utilization by DNA polymerase alpha-primase is influenced by its interaction with Mcm10p. *J Biol Chem* **279**: 16144-16153.
- Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., Lobanenko, V.V.** (1996): An exceptional conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* **16**: 2802-2813.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat* **391**: 806-811.
- Gaal, J.C., Smith, K.R., Pearson, C.K.** (1987): Cellular euthanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biochem Sci* **12**: 129-130.
- Gartel, A.L., Shchors, K.** (2003): Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* **283**: 17-21.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N.** (2000): The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-699.
- Greer, D.A., Besley, B.D.A., Kennedy, K.B., Davey, S.** (2003): hRad9 rapidly binds DNA containing double-strand breaks and is required for damage-dependent topoisomerase II β binding protein 1 focus formation. *Cancer Res* **63**: 4829-4835.
- Guo, S., Kemphues, K.J.** (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **19**: 611-20.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J.** (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**: 110-119.

- Hammond, S.M., Bernssein, E., Beach, D., Hannon, G.J.** (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nat* **404**: 293-296.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **4**: 557-580.
- Harrington, MA., Edenberg, HJ., Saxman, S., Pedigo, LM., Daub, R., Broxmeyer, HE.** (1991): Cloning and characterization of the murine promoter for the colony-stimulating factor-1-encoding gene. *Gene* **102**(2):165-70
- Hartwell, L.H., Weinert, T.A.** (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-34.
- Hashimoto, Y., Takisawa, H.** (2003): *Xenopus* Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication. *EMBO* **22**: 2526-2535.
- Hermeking, H.** (2003): The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev* **3**: 931-943.
- Hildesheim, J., Bulavin, DY., Anver, MR., Alvord, WG., Hollander, MC., Yardanian, L., Fornace, AJ.** (2002): Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* **15**: 7305-15.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.-P., Haenel, F., Eilers, M.** (2002): Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* **10**: 509-521.
- Hoeijmakers, J.H.** (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
- Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H., Nakao, M.** (2002): Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J Biol Chem* **277**: 3599-3605.
- Hong, S.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L.** (2004): Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signalling. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 259-264.
- Hsieh, J.-K., Yap, D. O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., und Lu, X.** (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 78-93.
- Huyton, T., Bates, P.A., Zhang, X., Sternberg, M.J.E., Freemont, P.S.** (2000): The BRCA1 terminal domain: structure and function. *Mut Res* **460**: 319-332.
- Irwin, M., Martin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., und Kaelin, W.G. Jr.** (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**: 645-48.

- Izumi, H., Molander, C., Penn, L.Z., Ishisaki, A., Kohno, K., Funa, K.** (2001): Mechanisms for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* **114**: 1533-1544.
- Izumi, M., Yanagi, K.-I., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K.-Y., Hurwitz, J., Yatagai, F., Hanaoka, F.** (2000): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G₂ phase. *Nucl Acid Res* **28**: 4769-4777.
- Jackson, A.L., Linsley, P.S.** (2004): Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* **20**: 521-524.
- Jurvansuu, J., Raj, K., Stasiak, A., Beard, P.** (2005): Viral transport of DNA damage that mimics a stalled replication fork. *J Virol* **79**: 569-580.
- Kagami, S., Saeki, H., Komine, M., Kakinuma, T., Nakamura, K., Tsunemi, Y., Sasaki, K., Asahina, A., and Tamaki, K.** (2006). CCL28 production in HatCaT cells was mediated by different signal pathways from CCL27. *Exp. Dermatol.* **15**: 95-100.
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A., Araki, H.** (1998): Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* **18**: 6102-6109.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S., Sugino, A.** (2000): Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **12**: 975-989.
- Kenderell, J.R., Carthew, R.W.** (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotech* **18**: 896-898.
- Khachigian, L.M., Lindner, V., Williams, A.J. and Collins, T.** (1996): Egr-1 induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* **271**: 1427-1430.
- Kickhoefer, V.A., Stephen, A.G., Harrington, L., Robinson, M.O., Rome, L.H.** (1999): Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* **274**: 32712-32717.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., Kraus, W.L.** (2004): NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* **119**: 803-814.
- Kim, J.-E., McAvoy, S.A., Smith, D.I., and Chen, J.** (2005) Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10907-10915.
- Kime, L., Wright, S.C.** (2003): *Mad4* is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J* **370**: 291-298.

- Koonin, E.V., Altschul, S.F., Bork, P.** (1996): BRCA1 protein products, functional motifs. *Nat Genet* **13**: 266-268.
- Krauss, G.** (2003): Biochemistry of signal transduction and regulation. Wiley-VCH.
- Krämer, B., Meichle, A., Hensel, G., Charnay, P. and Krönke, M.** (1994): Characterization of Krox-24/Egr-1 responsive element in human tumor necrosis factor promoter. *Biochem. Biophys. Acta* **1219**: 413-421.
- Kukimoto, I., Igaki, H., Kanda, T.** (1999): Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase α . *Eur J Biochem* **265**: 936-943.
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **15**: 680-685.
- Lee, D., Kim, J.W., Kim, K., Joe, C.O., Schreiber, V., Menissier-de Murcia, J., Choe, J.** (2002): Functional interaction between human papillomavirus type 18 E2 and poly(ADP-ribose)polymerase 1. *Oncogene* **21**: 5877-5885.
- Lei, M., Tye, B.K.** (2001): Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* **114**: 1447-1454.
- Lemaire, P., Vesque, C., Schmitt, J., Stunnenberg, H., Frank, R. and Charnay, P.** (1990): The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3456-2467.
- Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., Tomkinson, A.E.** (2003): Physical and functional interaction between DNA Ligase III α and poly(ADP-ribose)polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**: 5919-5927.
- Levens, D.L.** (2003): Disentangling the MYC web. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 5757-5759.
- Levens, D.L.** (2003): Reconstructing Myc. *Genes Dev* **17**: 1071-1077.
- Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R.P., Adamson, E.** (1999) The transcription factor Egr-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor- β 1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 4400-4411.
- Lin, W.-C., Lin, F.-T., Nevins, J.R.** (2001): Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**: 1833-1844.
- Liu, J., Grogan, L., Nau, M., Allegra, C.J., Chu, E. and Wright, J.J.** (2001): Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1. *Int. J. Oncol.* **18**: 863-870.

- Liu, K., Lin, F.-T., Ruppert, M., Lin, W.-C.** (2003): Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol* **23**: 3287-3304.
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.-T., Lin, W.-C.** (2004): TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev* **18**: 673-686.
- Makiniemi, M., Hillukkala, T., Tuusa, J., Reini, K., Vaara, M., Huang, D., Pospiech, H., Majuri, I., Westerling, T., Mäkelä, T.P., Syväoja, J.E.** (2001): BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem* **32**: 30399-30406.
- Maltzman, J. S., Carman, J.A. and Monroe, J. G.** (1996): Role of Egr-1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2283-2294.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A., Yaffe, M.B.** (2003): BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* **302**: 636-639.
- Marchetti, M.A., Kumar, S., Hartsuiker, E., Maftahi, M., Carr, A.M., Freyer, G.A., Burhans, W.C., Huberman, J.A.** (2001): A single unbranched S-phase DNA damage and replication fork blockage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7472-7477.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T.** (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-De Murcia, J., De Murcia G.** (1998): XRCC1 is specifically associated with Poly(ADP-ribose)Polymerase and negatively regulates its activity following DANN damage. *Mol Cell Biol* **18**: 3563-3571.
- Masumoto, H., Sugino, A., Araki, H.** (2000): Dpb11 controls the association between DNA polymerases α and ϵ and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 2809-2817.
- McFarlane, R.J., Carr, A.M., Price, C.** (1997): Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rad4/cut5 mutant phenotypes: dissection of DNA replication and G2 checkpoint control function. *Mol Gen Genet* **255**: 332-340.
- Mendez, J., Stillman, B.** (2000): Chromatin Association of Human Origin Recognition Complex, Cdc6, and Minichromosome Maintenance Proteins during the Cell Cycle: Assembly of Prereplication Complexes in Late Mitosis. *Mol Cell Biol* **20**: 8602-8612.
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T., Takisawa, H.** (2000): Central role for Cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Gen Cells* **5**: 439-452.

- Mimura, S., Takisawa, H.** (1998): *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase α onto chromatin under the control of S-phase cdk. *EMBO* **17**: 5699-5707.
- Nagase T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N., Nomura, N.** (1996): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res* **3**:321-329, 341-354.
- Nasheuer, H.P., Smith, R.W.P., Bauerschmidt, C., Grosse, F., Weisshart, K.** (2002): Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 41-94.
- Nikam, S.S., Tennekoon, G.I., Christy, B.A., Yoshino, J. E. and Rutkowski, J.L.** (1995): The zunc finger transcription factor zif268 Egr-1 is essential for Swann cell expression of p75NGF receptor. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**: 337-348.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., Nurse, P.** (2000): The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nat* **404**: 625-628.
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarzov, P., Schwob, E.** (2000): Hierachy of S-phase promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation. *Mol Cell Biol* **20**: 3795-3806.
- Nykanen, A., Haley, B., Zamore, P.D.** (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the interference pathway. *Cell* **107**: 309-321.
- Ogawa, Y., Takahashi, T., Masukata, H.** (1999): Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* **19**: 7228-7236.
- O'Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., Hottiger, M.O.** (2003): Transcriptional coactivation of nuclear factor- κ B-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* **278**: 45145-45153.
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., Yasui, A.** (2003): Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* **23**: 3974-3981.
- Osborn, J.A., Elledge, S.J., Zou, L.** (2002): Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**: 509-516.
- Pan, H., Yin, C., Dyson, N.J., Harlow, E., Yamasaki, L., van Dyke, T.** (1998): Key roles for E2F1 in signalling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell* **2**: 283-292.

- Parrilla-Castellar, E.R., Karnitz, L.M.** (2003): Cut5 is required for the binding of ATR and DNA polymerase α to genotoxin-damaged chromatin. *J Biol Chem* **278**: 45507-45511.
- Patwardhan, S., Gashler, A., Siegel, M. G., Chang, L.C., Joseph, L.J., Shows, T.B., Le Beau, M.M. and Sukhatme, V.P.** (1991): Egr-3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* **6**: 917-928.
- Perera, D., Perez-Hidalgo, L., Moens, P.B., Reini, K., Lakin, N., Syväoja, J.E., San-Segundo, P.A., Freire, R.** (2004): TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role for TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell* **15**: 1568-1579.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F., Eilers, M.** (1997): An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J* **16**: 5672-5686.
- Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., und Vousden, K.H.** (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* **11**: 1853-63.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., und Vousden, K.H.** (1999). E2F1 potentiates cell death by blocking anti-apoptotic signalling pathways. *Mol. Cell* **4**: 771-81.
- Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J., und Johnson, D.G.** (1998a). Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8858-63.
- Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J., und Johnson, D.G.** (1998b). Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene* **16**: 1267-76.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., Althaus, F.R.** (2000): Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* **275**: 40974-40980.
- Pospiech, H., Kursula, I., Abdel-Aziz, W., Malkas, L., Uitto, L., Kastelli, M., Vihinen-Ranta, M., Eskelinen, S., Syväoja, J.E.** (1999): A neutralizing antibody against human DNA polymerase ϵ inhibits cellular but not SV40 DNA replication. *Nucl Acid Res* **27**: 3799-3804.
- Potter, T., Gohde, W., Wedemeyer, N., Kohnlein, N.** (2000): Keratinocytes exposed to ultraviolet radiation reveal three down-regulated genes with potential function in differentiation and cell cycle control. *Radiat.Res.* **154**: 151-8
- Qin, XQ., Livingston, DM., Kaelin, WG., Adams, PD.** (1994): Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**: 10918-22

- Reale, A., De Matteis, G., Galleazzi, G., Zampieri, M., Caiafa, P.** (2005): Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* **24**: 13-19.
- Reini, K., Uitto, L., Perera, D., Moens, P.B., Freire, R., Syväoja, J.E.** (2004): TopBP1 localises to centrosomes in mitosis and to chromosome cores in meiosis. *Chromsoma* **112**: 323-330.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., Dynlacht, B.D.** (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G₂/M checkpoints. *Genes Dev* **16**: 245-256.
- Ricke, R.M., Bielinsky, A.K.** (2004): Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* **16**: 173-178.
- Skerka, C., Decker, E.L. and Zipfel, P.F.** (1995): A regulatory element in the human Interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and Egr-1. *J. Biol. Chem.* **38**: 22500-22506.
- Rodriguez, M., Yu, X., Chen, J., Songyang, Z.** (2003): Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* **278**: 52914-52918.
- Roussel, M.F.** (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**: 5311-5317.
- Roy, A.L., Malik, S., Meisterernst, M., Roeder, R.G.** (1993): An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* **365**: 355-359.
- Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M.Z., Gertler, F.B., Scott, M.L., Van Parijs, L.** (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**: 401-406.
- Russel, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., und Johnson, D.G.** (2002). ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1360-68.
- Saha, P., Thome, K.C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Weremowicz, S., Dutta, A.** (1998): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *Cdc45*. *J Biol Chem* **273**: 18205-18209.
- Saka, Y., Fantes, P., Sutani, T., McInerney, C., Creanor, J., Yanagida, M.** (1994): Fission yeast Cut5 links nuclear chromatin and M phase regulator in the replication checkpoint control. *EMBO* **13**: 5319-5329.
- Saka, Y., Yanagida, M.** (1993): Fission yeast *cut5+*, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene *rad4+*. *Cell* **74**: 383-393.

- Sakamoto, K.M., Bardeleben, C., Yates, K.E., Raines, M.A., Golde, D.W., Gasson, J.C.** (1991): 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* **6**: 867-71
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., Collins, F.S.** (2003): Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1892-1897.
- Schagger, H., von Jagow, G.** (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Sen, G., Wehrman, T.S., Myers, J.W., Blau, H.M.** (2004): Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet* **36**: 183-189.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., Massague, J.** (2001): TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15^{INK4b}. *Nat Cell Biol* **3**: 400-408.
- Seoane, J., Le, H.-V., Massague, J.** (2002): Myc suppression of the p21^{Cip1} Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response DNA damage. *Nature* **419**: 729-734.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M.** (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-1512.
- Shiloh, Y.** (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev* **3**: 155-168.
- Shirane, D., Sugao, K., Namiki, S., Tanabe, M., Iino, M., Hirose, K.** (2004): Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet* **36**: 190-196.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G.V., Artani, S., Goff, S.P., Calame, K.** (1993): Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* **262**: 1889-1892.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Luo, R.B., Samara, R., Espinoza, L.A., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Smulson, M.E.** (2003): PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene* **22**: 8460-8471.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massague, J., Hänel, F., Eilers, M.** (2001): Repression of p15^{INK4b} expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**: 392-399.

- Stoeber, K., Tlsty, T.D., Happerfield, L., Thomas, G.A., Romanov, S., Bobrow, L., Williams, E.D., Williams, G.H.** (2001): DNA Replication Licensing and Human Cell Proliferation. *J Cell Sci* **114**: 2027-2041.
- St. Onge, R.P., Udell, C.M., Casselman, R., Davey, S.** (1999): The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* **10**: 1985-1995.
- Sugimura, T., Fujimura, S., Hasegawa, S., Kawamura, Y.** (1967): Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate ribose moiety of NAD by rat liver nuclear enzyme. *Biochim Biophys Acta* **138**: 438-441.
- Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C., Shi, Y.** (2002): A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5515-5520.
- Szabo, C.** (2000): Cell death. The role of PARP. CRC Press
- Ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H.** (2000): Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* **25**: 64-70.
- Tercero, J.A., Labib, K., Diffley, J.F.X.** (2000): DNA synthesis at individual replication forks requires the essential factor Cdc45p. *EMBO J* **19**: 2082-2093.
- Tolbert, D., Lu, X., Yin, C., Tantama, M., van Dyke, T.** (2002): p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol.Cell.Biol.* **22**: 370-7
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R., Bishop, J.M.** (2001): c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* **414**: 768-773.
- Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, JF., Aberdam, D., Virolle, T.** (2005): NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* **12**: 128-37
- Vance, V., Vaucheret, H.** (2001): RNA silencing in plants – defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280.
- Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.-P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H.** (2002): The β -Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**: 241-250.
- Van Haften, G., Vastenhouw, N.L., Nollen, E.A.A., Plasterk, R.H.A., Tijsterman, M.** (2004): Gene interactions in the DNA damage-response pathway identified by genome-wide RNA-interference analysis of synthetic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12992-12996.

- Van Hatten, R.A., Tutter, A.V., Holway, A.H., Khederian, A.M., Walter, J.C., et al.** (2002) The *Xenopus* Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication. *J. Cell Biol.* **159**, 541-547.
- Wang H., Elledge, S.J.** (1999): *DRC1*, DNA replication and checkpoint protein1, functions with *DPB11* to control DNA replication and the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3824-3829.
- Wang, H., Elledge, S.J.** (2002): Genetic and physical interaction between *DPB11* and *DDC1* in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics* **160**: 1295-1304.
- Wanzel, M., Herold, S., Eilers, M.** (2003): Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* **13**: 146-150.
- Wanzel, M., Kleine-Kholbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., Eilers, M.** (2005): Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol.* **7**: 30-41.
- Wieland, G.D., Nehmann, N., Muller, D., Eibel, H., Siebenlist, U., Suhnel, J., Zipfel, P.F., Skerka, C.** (2005): Early growth response proteins EGR-4 and EGR-3 interact with immune inflammatory mediators NF-kappaB p50 and p65. *J. Cell Sci.* **15**: 3203-12
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R.** (1978): Biochemical transfer of single copy eukaryotic genes using total cellular DANN as donor. *Cell* **14**: 725-731.
- Wohlschlegel, J.A., Dhar, S.K., Prokhorova, T.A., Dutta, A., Walter, J.C.** (2002): *Xenopus* Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* **2**: 233-240.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., Larsson, L.-G.** (2003): Myc represses differentiation-induced *p21CIP1* expression via Miz-1-dependent interaction with the *p21* core promoter. *Oncogene* **22**: 351-360.
- Xu, Z.-X., Timanova-Atanasova, A., Zhao, R.-X., Chang, K.-S.** (2003): PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* **23**: 4247-4256.
- Yamamoto, R.R., Axton, J.M., Yamamoto, Y., Saunders, R.D.C., Glover, D.M., Henderson, D.S.** (2000): The *Drosophila mus101* gene, which links DNA repair, replication and condensation of heterochromatin in mitosis, encodes a protein with seven BRCA1 C-terminus domains. *Genetics* **156**: 711-721.
- Yamane, K., Chen, J., Kinsella, T.J.** (2003): Both DNA topoisomerase II-binding protein 1 and BRCA1 regulate the G₂-M cell cycle checkpoint. *Cancer Res* **63**: 3049-3053.

- Yamane, K., Katayama, E., Tsuruo, T.** (2001): p53 contains a DNA break-binding motif similar to the functional part of BRCT-related region of Rb. *Oncogene* **20**: 2859-2867.
- Yamane, K., Kawabata, M., Tsuruo, T.** (1997): A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* **250**: 794-799.
- Yamane, K., Tsuruo, T.** (1999): Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. *Oncogene* **18**: 5194-5203.
- Yamane, K., Wu, X., Chen, J.** (2002): A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* **22**: 555-566.
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, W.O., Dyson, N.J., Harlow, E., Jacks, T.** (1998): Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat. Genet.* **18**: 360-4.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., Fitzgerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofman, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L.P., Sonenshein, G.E.** (2001): Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**: 1688-1702.
- Yao, Y.M., Bahrami, S., Redl, H., Fuerst, S., Schlag, G.** (1997): IL-6 release after intestinal ischemia/reperfusion in rats is under partial control of TNF. *J.Surg.Res.* **70**(1):21-6
- Yoshida, K., Inoue, I.** (2004): Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor. *Oncogene* **1**-11.
- Yu, X., Christiano, C., Chini, S., He, M., Mer, G., Chen, J.** (2003): The BRCT-domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302**: 639-642.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P.** (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.
- Zhang, X., Morera, S., Bates, P.A., Whitehead, P.C., Coffey, A.I., Hainbucher, K., Nash, R., Sternberg, M.J., Lindahl, T., Freemont, P.S.** (1998): Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO J* **17**: 6404-6411.
- Zheng, C.-F., Guan, K.-L.** (1994): Cytoplasmic localisation of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J Biol Chem* **269**: 19947-19952.
- Zhou, B.-B. S., Elledge, S.J.** (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439.

Zipfel, P.F., Nehmann, N., Eibel, H., Siebenlist, U. and Skerka, C. (2003): Early growth Response Protein Egr-4 interacts with immune inflammatory mediators NF- κ B p65 and p50. J. Biol. Chem.

Die vorliegende Arbeit am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Saluz danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Dissertation anzufertigen. Seine vielfältige Unterstützung war mir, ebenso wie die wissenschaftlichen Anregungen, eine große Hilfe

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Hänel der mir das Thema bereitstellte und mich jederzeit unterstützte und ermutigte. Seine fachliche Hilfe im Rahmen der Arbeit und viele anregende Diskussionen haben mir in schwierigen Situationen stets weitergeholfen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Claudia Franke und Yvonne Wollmann für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und technische Unterstützung.

Für die freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich weiterhin bei Uta Schmidt, Grit Mrotzek und Sweta Bauer, sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie für die Ermutigung und Unterstützung bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die mich über die Jahre immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dörthe Peter bedanken, die mit unerschütterlicher Geduld Geschichten aus dem Labor ertragen hat und mir in schwierigen Situationen durch aufmunternde Gespräche und Humor vieles erleichterte.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät ist mir bekannt.

Jena, 27. Juni 2006